

農産物由来食品成分の腸内発酵および脂質代謝  
に関する研究

平成 29 年 3 月  
(2017 年)

川上 秋桜

Effect of food components derived from agricultural  
products on intestinal fermentation  
and lipid metabolism

March 2017

Sakura KAWAKAMI

# 目次

緒論	1
第1章 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 誘発マウスにおけるベタインの病態進行予防効果	
1. 緒言	6
2. 実験方法	10
3. 結果	14
4. 考察	26
第2章 2種のマッシュルーム ( <i>Agaricus bisporus</i> ) の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 試験における腸内発酵および脂質代謝改善効果	
1. 緒言	30
2. 実験方法	32
3. 結果	39
4. 考察	59
第3章 乾燥ポテト粉末製造工程における各段階のポテト粉末の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 試験における腸内発酵および脂質代謝改善効果	
1. 緒言	65
2. 実験方法	67
3. 結果	74
4. 考察	99
総合考察	104
要約	107

Abstract	109
参考文献	112
謝辞	137

## 緒論

近年、わが国では食習慣の変化やストレス、運動不足、喫煙、アルコール摂取等が原因による各種生活習慣病の拡大が深刻な問題となっている。厚生労働省が3年ごとに実施している「患者調査」の平成26年度調査によると、国内の糖尿病の総患者数（継続的な治療を受けていると推測される患者数）は約317万人、大腸がんをはじめとするがんの総患者数は約163万人であり、年々大幅に増加していると報告されている<sup>1)</sup>。また、高齢化の進行に伴いアルツハイマー病など特有の疾病も増加していることから、医療費の増加や介護負担の増加等の問題も深刻化している。一方、様々な農産物や食品の機能性成分が人の健康に大きく貢献することが明らかになりつつあり、日常の食生活を通じた健康維持・増進、疾病の予防についての国全体の関心は高まっている。わが国では平成27年度から、企業などが食品の安全性と機能性に関する科学的根拠などを国に届け出れば、健康の維持及び増進に役立つという機能性を表示できる「機能性表示食品」<sup>2)</sup>制度が新たに施行され、それによって農産物や低次加工食品の機能性表示も認められるようになり、ますます身近な食品や農産物の機能性評価に注目が集まっている。その市場規模は平成27年には303億円、平成28年は699億円にのぼる見込みであるといわれている。

北海道十勝地域は日本有数の農業地帯であり、恵まれた気候や土地資源を活かし、様々な農作物が生産されている。耕地面積は25,499 haと全道の約22%を占め（平成26年度）<sup>3)</sup>、十勝地域の農業は毎年2千億円を超える農業粗生産を生みだし、地域経済を支える主要な産業であるとともに、国内の食料確保に重要な役割を果たしている。中でも馬鈴薯は様々な品種が栽培され、十勝地域

における馬鈴薯の生産量は 797,400 t であり全道の約 42% を占める（平成 25 年度）<sup>4)</sup> (Fig.1)。男爵薯，メイクイン，キタアカリ，とうやなどの生食用品種のほか，トヨシロ，きたひめ，スノーデンなどといった，マッシュポテトやポテトチップ，冷凍加工などに適した加工用品種も多い。またデンプンの原料として，産業用に広く栽培されている。甜菜（ビート）も主要作物として主に砂糖の原料として北海道で生産され，十勝地域の生産量は 1,579,000 t で全道の約 44% を占め（平成 26 年度）<sup>2)</sup>，ビート糖の生産量は年間 677,222 t にものぼる（平成 27 年度）<sup>5)</sup>。また砂糖を生産する過程で，副産物からオリゴ糖であるラフィノース，ビートベタイン，ビートファイバーなど，様々な機能性を持った成分が分離精製されている。その他十勝地域では，小麦，豆類が主要作物として栽培され，全国に広く流通し国内の食料安定供給に大きく貢献している。

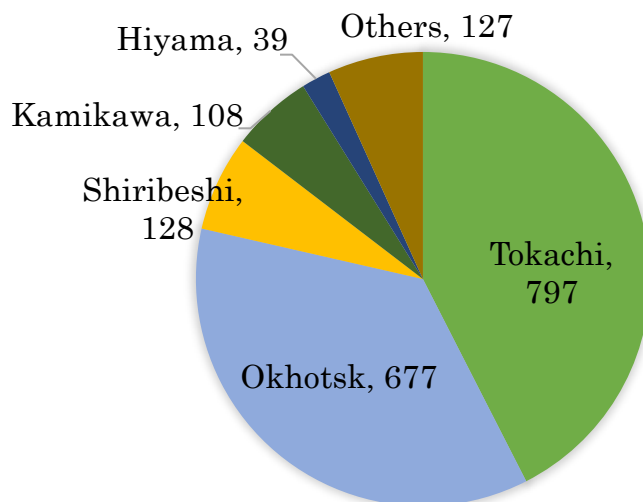


Fig.1. Potato production in Hokkaido (million kg)

しかしながらその一方で、わが国の農業は日本経済が低迷するなかで、農畜産物の輸入自由化等の国際化が急速に進展し、農村の過疎化、高齢化の進行、担い手の減少など様々な問題を抱えながら厳しい情勢となっている。これらの現状を踏まえ、日本でも高い水準にある北海道十勝地域の農業の発展に大きな期待が寄せられる。

以前より、十勝地域で生産される農産物や加工品の栄養成分や健康機能性評価は行われており、主要作物である馬鈴薯や豆類の難消化性デンプン（レジスタントスターチ）の健康機能性、とくにプレバイオティクス効果についても検討されている。レジスタントスターチは、デンプンでありながら水溶性・不溶性食物繊維の両方の性質をもつことが報告されている<sup>6)</sup>。通常摂取した食物は、消化酵素により消化され、消化管から吸収されるが、食物繊維やレジスタントスターチは、消化・吸収されずさまざまな生理作用をもたらす。小腸で吸収されず大腸に達したレジスタントスターチは、腸内細菌による分解発酵により短鎖脂肪酸を産生する基質としてはたらき、それによる腸内 pH の低下は腸内細菌叢を改善し、有用菌を増加させ整腸作用をもたらす<sup>7)</sup>。また、短鎖脂肪酸はコレステロールの合成を阻害する<sup>8)</sup>。食物繊維やレジスタントスターチには、血漿や肝臓内の脂質低下作用もあり、カルシウムやマグネシウムなどのミネラルの吸収を促進することも報告されている<sup>8)</sup>。例えば、十勝産小豆や金時豆、手亡豆の煮豆のデンプン画分に含まれるレジスタントスターチが、ラットの盲腸内短鎖脂肪酸を増やし、糞中への中性ステロール排泄を増加させることや<sup>10)</sup>、十勝産馬鈴薯の加工品であるポテトフレーク中のデンプンが、ラットの盲腸内短鎖脂肪酸を増加させ、盲腸内 pH を低下させることで整腸作用をもたらすとの報告がある<sup>11)</sup>。しかしながら、十勝地域の農産物には健康の維持・増進への寄与が期待できる未利用の素材が多くありながら、農産物や加工品の栄

養成分や健康機能性評価に関する報告は多くなく、それらの探索、分析、作用メカニズムの解明および評価方法の確立はまだ十分にされていない。

したがって本研究では、北海道十勝地域で生産される農産物由来の食品成分の健康機能性について検討することにより、食を通じた国民の健康維持・増進に寄与するとともに、農産物や加工品に新たな付加価値を付与することで十勝地域の一次産業の活性化を目指す。第1章では、十勝産ビートから砂糖を生産する際の副産物として取り出される糖蜜から得られるビートベタインの健康機能性、とくに今回は非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）誘発マウスを用い、肝機能に対するベタイン摂取の効果について報告する。次に第2章では、十勝地域で生産されている2種のマッシュルームについて、*in vitro* およびラットを用いた *in vivo* 試験により腸内環境と脂質代謝への影響に注目した研究結果を報告する。最後に第3章で、十勝産の馬鈴薯の加工品として、乾燥馬鈴薯粉末を製造する際の4段階の加工工程におけるポテト粉末の健康機能性、とくに腸内環境と脂質代謝へ与える影響について、*in vitro* および *in vivo* 試験によって検討した研究結果を報告する。



## 第 1 章

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）誘発マウスにおける  
ベタインの病態進行予防効果

## 1. 緒言

ベタイン (Betaine, Trimethylglycine) は、食事中または体内のコリンから合成される、分子量 117.2、構造は $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ で表される非毒性アミノ酸誘導体である。またベタインは、微生物や植物、動物中で重要な構成要素として存在し、微生物や植物中で細胞を環境ストレス（浸透圧や温度変化）から保護する役割を担っている<sup>1)</sup>。ベタインはビート (*Beta vulgaris*) 中に 0.07～0.30%含まれており、19 世紀中ごろビート糖の廃糖蜜から初めて単離された<sup>2)</sup>。ベタインはビートの非糖成分としては最も含有量の多いものの一つで、製糖技術において回収も比較的容易であることから、古くから利用が試みられており、わが国においてはクロマト分離により糖蜜から製造されている<sup>3)</sup> (Fig. 1)。

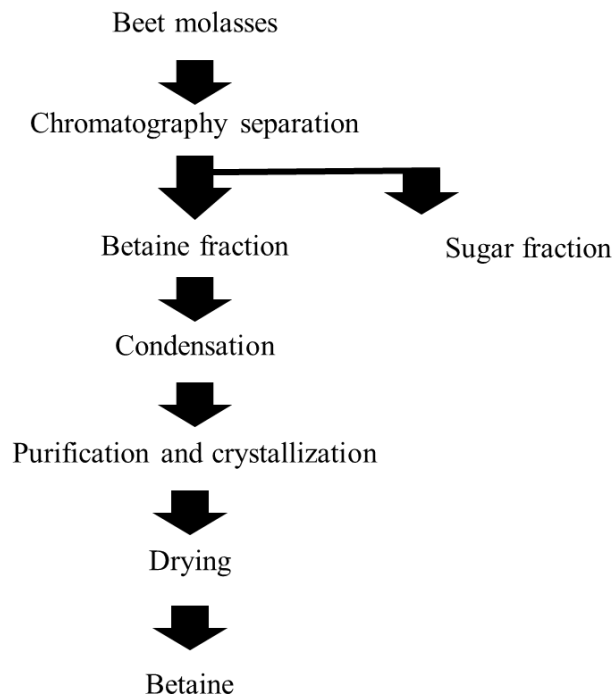


Fig.1. The extraction process of betaine.

ベタインは、動物の細胞内で浸透圧平衡を維持し、肝臓および腎臓の髄質の浸透圧調節物質として機能する<sup>4)</sup>。また、肝臓においてメチル基供与体として機能することもわかっており、家禽や魚飼料にメチオニンまたはコリンの代替として導入されてきた<sup>5)</sup>。

動脈硬化は、動脈の内壁が肥厚し伸展性の低下した状態のことであり、一般的な要因として脂質異常症や糖尿病が原因としてよく知られているが、近年では、血中ホモシステインも動脈硬化のリスクを高める要因の一つとして認識されている。ホモシステインはメチオニン代謝における中間代謝物で、血中において血管内皮を傷害し血栓形成の要因となり動脈硬化を促すといわれている<sup>6)</sup>。最近の研究では、ベタインはメチル基供与体として、ホモシステインのメチオニンへの代謝を促進することで、血中のホモシステイン濃度の上昇を抑制するという役割に焦点が向けられている<sup>7-9)</sup>。また、ベタインは脂肪肝、アテローム性動脈硬化症、高脂血症患者から採取した細胞中の脂肪蓄積を減らすことが明らかとなっており、脂肪親和性物質として機能すると考えられている<sup>10)</sup>。

以前、ラットにベタイン 1%および 2%添加食を 4 週間投与し、ベタインの肝機能に対する影響を検討した。その結果、肝障害の指標である血中におけるアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (Aspartate aminotransferase ; AST) やアラニンアミノ基転移酵素 (Alanine transaminase ; ALT) 活性および乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase ; LDH) レベルが、ベタイン 1%, 2%添加食を投与した両群で有意に低下した。また、抗酸化機能に関連するグルタチオンリダクターゼ (GR) 活性が、ベタイン 2%添加食を投与したラットの肝臓で有意に増加し、同時に還元型グルタチオン (GSH) レベルがベタインの摂取濃度に依存的に有意に増加した<sup>11)</sup>。これらの結果からベタイン摂取は健常ラットにおいて肝機能をより高めることが示唆された。さらに、8 週齢のラットにベタイン 1%および 2%添加食を 2 週

間投与し、解剖前に D-GalN を腹腔内投与し、肝障害への影響を検討した結果、D-GalN 投与による肝臓の炎症で増加した血中 ALT, AST, LDH, 肝臓中 GSH レベル, その他関連酵素である GR, グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx), グルタチオン s-トランスフェラーゼ (GST) 活性が, ベタイン 1% 添加食投与群では正常レベルに保持され, また, HDL-コレステロールとアテローム性動脈硬化指数も同様に正常レベルに保持されたことから, ベタインには, D-GalN による脂質代謝異常の抑制効果も認められた<sup>11)</sup>。しかしベタイン 2% 添加食投与ではそれらの効果が認められず, ベタインには有効な摂取量が存在すると考えられる。

#### 非アルコール性脂肪肝疾患 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFLD)

は, 肝細胞に脂肪沈着した単純性脂肪肝と, さらに肝細胞の壊死・炎症や線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (Non-Alcoholic Steatohepatitis ; NASH) に大別され, 発症原因にアルコールの摂取を含まないが, アルコール性肝疾患に似た症状の進展を示す進行性の疾患である<sup>12)</sup>。1980 年 Ludwig が, 多飲酒歴がないにもかかわらず肝硬変に進行した 20 症例を報告し, それを NASH と命名した<sup>13)</sup>。それ以降, 肥満の増加とともに NASH を発症する人が増えてきている<sup>14-16)</sup>。Matteoni ら (1999 年) は NASH 患者の 5~25% が肝硬変へと病状が進行し, その患者のうち 30~50% が 10 年の間に死に至ると報告しており<sup>17)</sup>, 早期発見と早期の治療開始が重要となる。しかし NASH には現在のところ確立した治療法がなく, 適応した治療薬は承認されていない。この場合, 食事療法や運動療法など, 生活習慣を見直し肥満を取り除くといった原因除去の方法をとる場合が多いが, 必ずしも改善するとは言えない。NASH の進行を促すメカニズムは, 現在のところ, 過栄養や運動不足などにより肝臓細胞に中性脂肪が沈着することで脂肪肝が発症し, さらに酸化ストレスや脂質過酸化, エンドトキシンなどにより惹起されるサイトカインの放出などによって肝細胞障害が引き起こ

され、脂肪性肝炎、肝硬変へと進展する（Two hit theory）と提唱されているが（Fig. 2）<sup>18-20</sup>，未だ不明な点が多く解明されていない。早急な NASH の複雑な作用機序の解明と，予防法や治療法の確立が必要である。

したがって本研究では，NASH モデルマウスを用いてビートベタイン投与による NASH への影響について検討を行った。

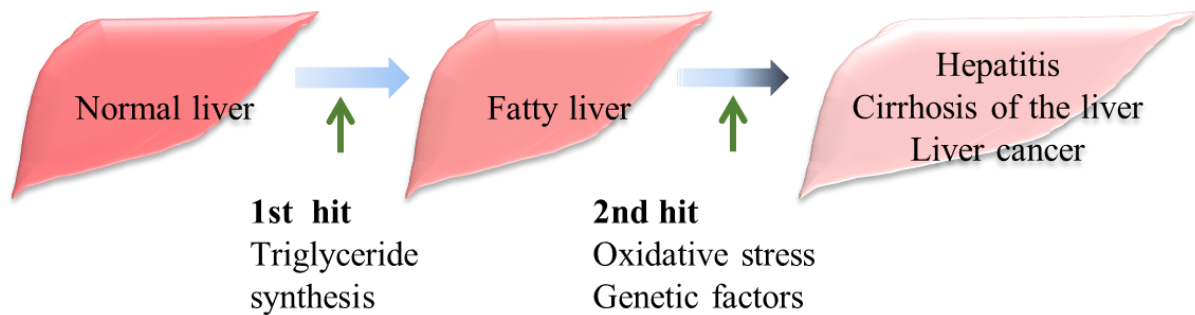


Fig.2. Schematic expression of NASH pathogenic mechanisms.

## 2. 実験方法

### 1. 実験試料

ベタインは日本甜菜製糖株式会社から提供されたものを用い、砂糖生産過程で発生するビート糖蜜からの副産物に由来する。

### 2. 実験動物および飼育条件

実験動物は、C57BL/6J-NASH モデルの雄性マウス 10 匹を用いた。2~3 匹ずつ、床敷（パルマス；株式会社 天然素材研究所，神奈川，日本）を敷いたマウスケージ（株式会社 夏目製作所，東京，日本）に入れ飼育した。NASH モデルマウスは，新生マウスにおいて糖尿病を引き起こすため，少量のストレプトゾトシンを注射し，その後高脂肪食投与により脂肪症や軽度または重度の肝炎を進行させる方法で作成した<sup>21)</sup>。4 週齢から食餌は High Fat Diet 32（日本クレア株式会社，東京，日本），および給水は自由摂取とした。5 週齢時の体重結果により，群分けを行った。蒸留水摂取群を Vehicle 群，ベタイン摂取群を Betaine 群とした。試験の開始時，試験群で体重の有意差はなかった。なお High Fat Diet 32 の組成は Table 1 に示す。

Table 1. Composition of the High Fat Diet 32 (%).

Milk casein	24.5
Albumin powder	5.0
L-cysteine	0.43
Lard	15.88
High oleic safflower oil	20.0
Cellulose	5.5
Maltodextrin	8.25
Lactose	6.928
Sucrose	6.75
Vitamin mix (AIN93G)	1.4
Mineral mix (AIN93G)	5.0
Choline bitartrate	0.36
t-butylhydroquinone	0.002

ベタインを蒸留水で最終濃度 50 mg/ml になるように調整した。本研究におけるベタインの投与量は、飲料水中のベタイン 0.5% (w/v) 濃度 (25~35 mg/25~27 g マウス/日 ; 通常の 1 日の飲料水量 5~7 mL から計算した) で、マウスのアルコール性脂肪肝および肝障害に対する保護効果を示したという Ji と Kaplowitz (2003 年) による、以前の報告を基準とした<sup>22)</sup>。蒸留水およびベタインは、10 ml/kg 体重を 1 日 2 回に分けて 3 週間強制経口投与した。1 日 1 回、午前中に体重測定を行った。投与最終日の 8 週齢時に、全個体についてジエチルエーテル吸入麻酔下で全採血・解剖および肝臓のサンプリングを行い、肝臓サンプルはパラフィンおよび凍結切片を作製し、それぞれヘマトキシリン・エオシン染色およびオイルレッド染色を行った。その他の血清および肝臓サンプルは、分析開始まで -80°C で凍結保存した。

実験動物の取り扱いについては Guide of Care and Use of Laboratory (1985 年) に従った<sup>23)</sup>。

### 3. 血清中の生化学的分析

AST, ALT, TG の測定は, 酵素分析キット (Fuji Dri- Chem system ; 富士フィルム株式会社, 東京, 日本) を用い, FUJI Dri-Chem7000 (富士フィルム株式会社) で決定した。点着量は 10  $\mu$ l とし, 測定範囲上限を超えた場合は生理食塩水で希釈して測定を行い, 希釈率を用いて換算した。

### 4. 肝臓 TG 濃度

イソプロパノールに溶かした総脂質における肝臓中中性脂肪レベルを, アッセイキット (トリグリセライド E-テストワコー ; 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を用いて定量した。

### 5. 肝臓中グルタチオン (GSH) 測定

内側右葉の肝重量を測定後, 100 mg の肝重量に対して 1 ml の割合で氷冷 PBS を加えホモジナイズし, Senso Lyte Total GSH Assay Kit, (Colorimetric ; Ana Spec, Inc., CA, USA) を用い, 遠心分離および除タンパクを行った。除タンパク後の上清サンプル 10  $\mu$ l (肝重量換算 0.2 mg) を 96 well プレートに添加し, Cohn と Lyle (1966 年) の方法<sup>24)</sup> を用いて総 GSH の測定を行った (励起波長 342 nm, 放射波長 428 nm)。得られた総 GSH 量から, 肝臓 1 g 当たりの GSH 量を算出した。

### 6. 病理組織学的検査

#### 1) ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色

マウス肝臓を Bouin's solution (SIGMA-ALDRICH, MO, USA) にて固定し,



脱水および透徹の後、パラフィン包埋を行った。パラフィンブロックから厚さ 4  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、HE 染色を行った。標本はアルコール-キシレン系列で脱水および透徹を行った後、封入剤（MP-500；松浪硝子工業，大阪，日本）を用いて封入した。

## 2) オイルレッド染色

マウス肝臓の凍結切片を作製後、オイルレッド染色を行い、封入剤（Aquatex；Merk, DA, GER）を用いて封入した。

## 7. 統計処理

各群の平均値の差の検定は Student's t-test を用いて、それぞれ有意水準 5% で行った。データは平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

### 3. 結果

#### 1. 体重推移

Fig. 3 に体重の推移を示した。5 週齢から解剖当日までの体重を測定した結果、Vehicle 群および Betaine 群ともに経時的な体重増加傾向が認められたが、両群間に有意な差は認められなかった。

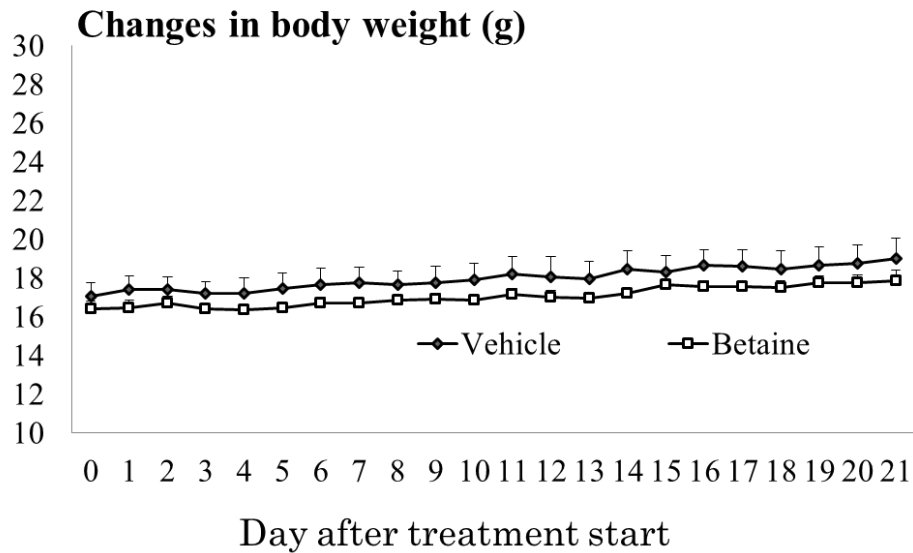


Fig.3. Changes in body weight of NASH model mice fed Vehicle and Betaine for 3 weeks.

Each value represents the mean for measurements carried out on five mice, and the standard deviation is represented by vertical bars.

## 2. 肝臓重量

Fig. 4 に肝重量の変動を示した。両群間に有意な差は認められなかった。

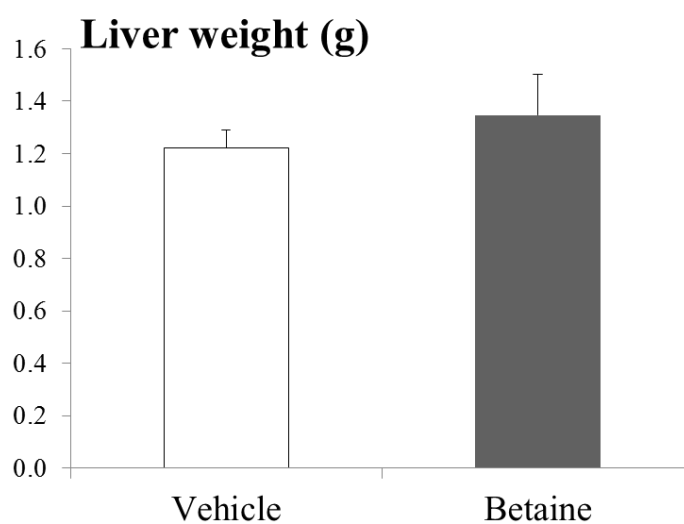


Fig.4. Liver weight of NASH model mice fed Vehicle and Betaine for 3 weeks.

Each value represents the mean for measurements carried out on five mice, and the standard deviation is represented by vertical bars.

### 3. 肝重量体重比

Fig. 5 に肝重量体重比の変動を示した。Betaine 群で Vehicle 群に対し肝重量体重比の有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。

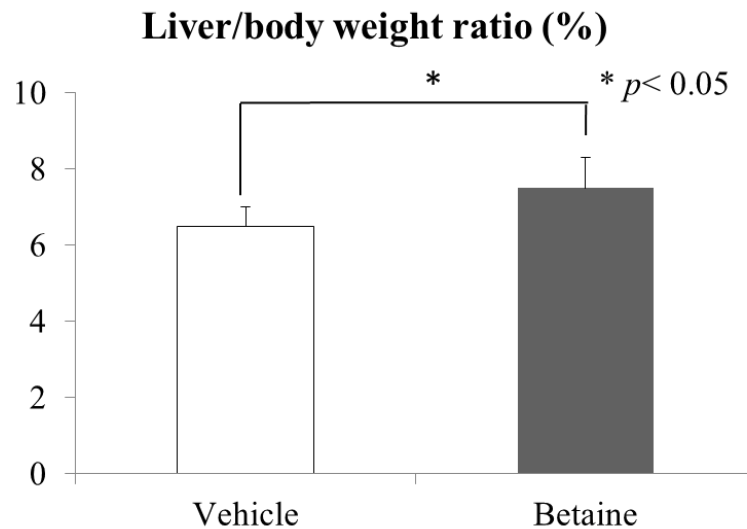


Fig.5. Liver/body weight ratio of NASH model mice fed Vehicle and Betaine for 3 weeks.

Each value represents the mean for measurements carried out on five mice, and the standard deviation is represented by vertical bars. Significantly different ( $p < 0.05$ ) was determined by the Student's t-test.

#### 4. 血液生化学検査

##### 1) AST 活性

Fig. 6a に血清 AST 値の変動を示した。両群間で有意な差は認められなかった。

##### 2) ALT 活性

Fig. 6b に血清 ALT 値の変動を示した。両群間で有意な差は認められなかった。

##### 3) TG 濃度

Fig. 6c に血清 TG 濃度の変動を示した。両群間で有意な差は認められなかった。

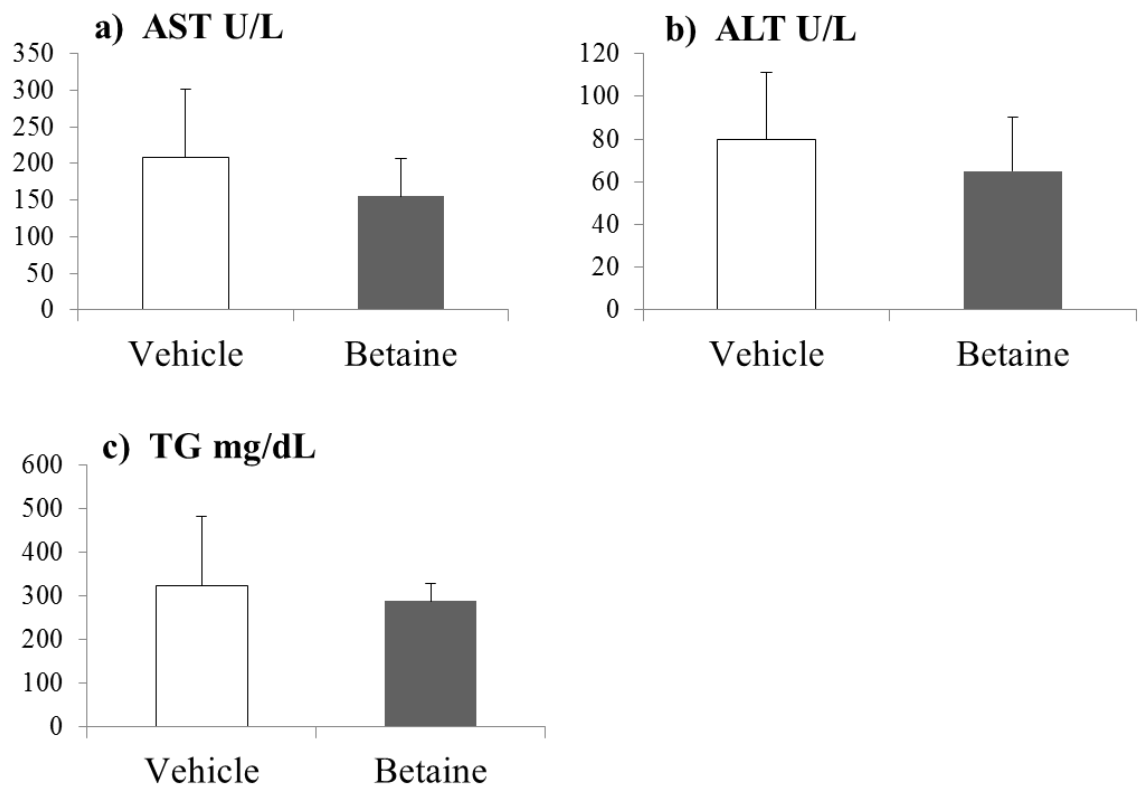


Fig.6. serum AST and ALT activities and TG concentrations of NASH model mice fed Vehicle and Betaine for 3 weeks.

Each value represents the mean for measurements carried out on five mice, and the standard deviation is represented by vertical bars.

## 5. 肝臓中 GSH 量

Fig. 7 に肝臓中 GSH 量の変動を示した。両群間で有意な差は認められなかった。

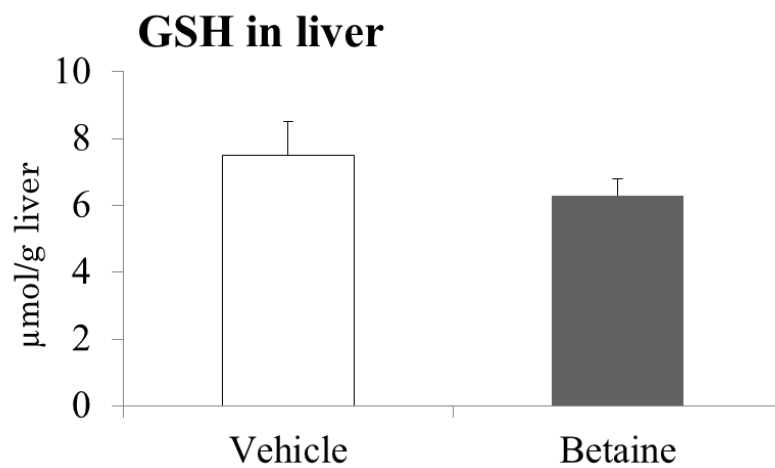


Fig.7. Liver total Glutathione (GSH) concentrations of NASH model mice fed Vehicle and Betaine for 3 weeks.

Each value represents the mean for measurements carried out on five mice, and the standard deviation is represented by vertical bars.

## 6. 病理組織学的検査

### 1) HE 染色

Fig. 8 および 9 に、HE 染色後の細胞写真を示した。HE 染色像の病理学的解析の結果、Vehicle 群においては、肝細胞の膨化および壊死が顕著に観察され、単核球の浸潤を主とする炎症性細胞の浸潤像が観察された。Betaine 群では、5 匹中 4 匹において中心静脈周囲の肝細胞障害および壊死は抑制されていた。

### 2) オイルレッド染色

Fig. 10 および 11 に、オイルレッド染色後の細胞写真を示した。オイルレッド染色像の病理学的解析の結果、Vehicle 群では中心静脈周囲の肝細胞において大滴性および小滴性の脂肪沈着が顕著に観察された。Betaine 群では、5 匹中 3 匹において、肝細胞の脂肪沈着が顕著に抑制されており、その他 2 個体においても、Vehicle 群と比べて、脂肪沈着の程度は軽度であった。Betaine 群におけるオイルレッド染色域の面積は  $0.82 \pm 0.85\%$  であり、Vehicle 群の  $9.06 \pm 2.24\%$  より有意に低値を示した ( $p < 0.001$ ) (Fig.12)。



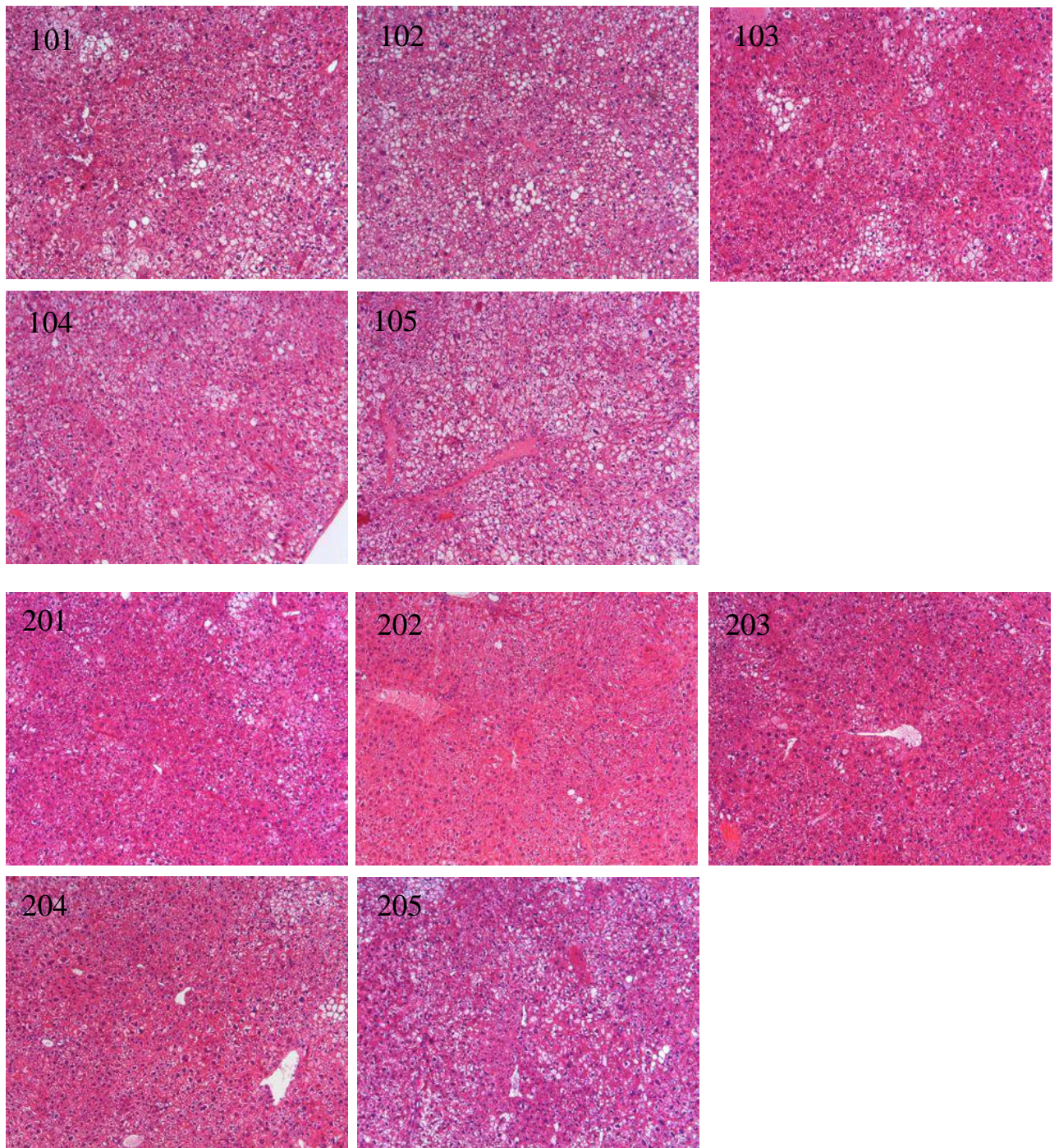


Fig.8. Histopathological changes (Hematoxylin-eosin stain) $\times$ 100 of NASH model mice fed Vehicle (101~105) and Betaine (201~205) for 3 weeks.

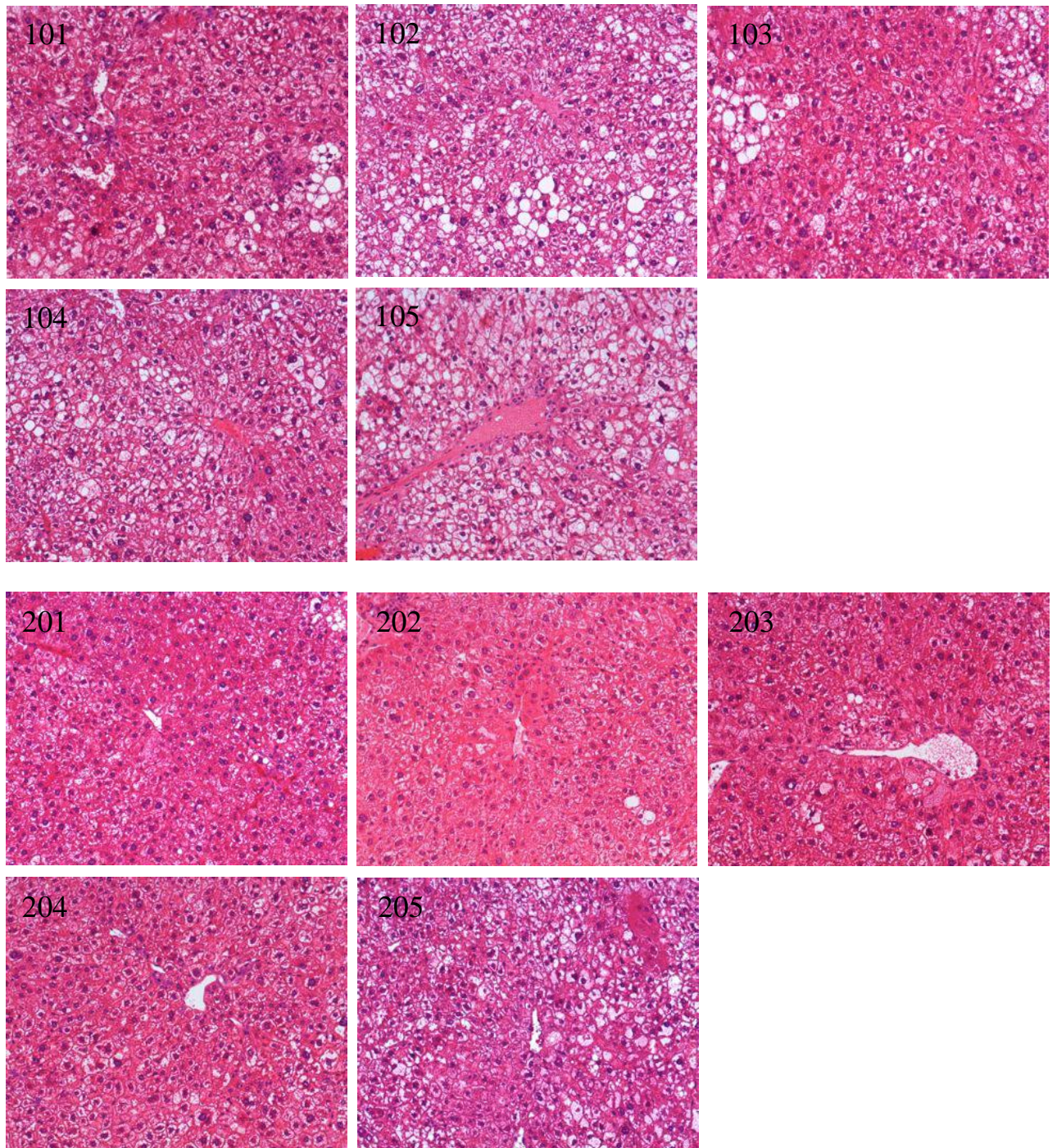


Fig.9. Histopathological changes (Hematoxylin-eosin stain) $\times$ 200 of NASH model mice fed Vehicle (101~105) and Betaine (201~205) for 3 weeks.

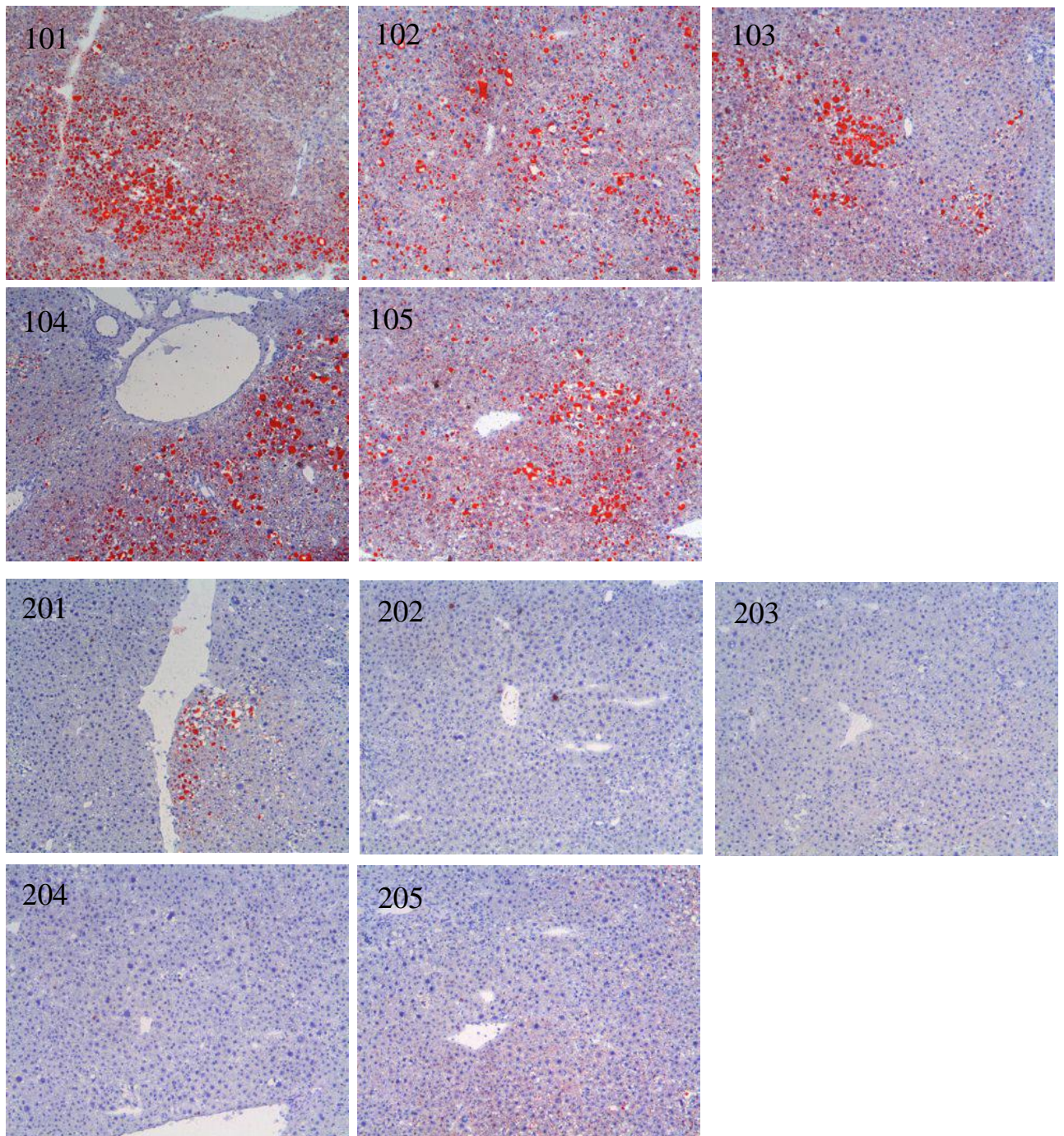


Fig.10. Histopathological changes (Oil red stain) $\times 100$  of NASH model mice fed Vehicle (101~105) and Betaine (201~205) for 3 weeks.

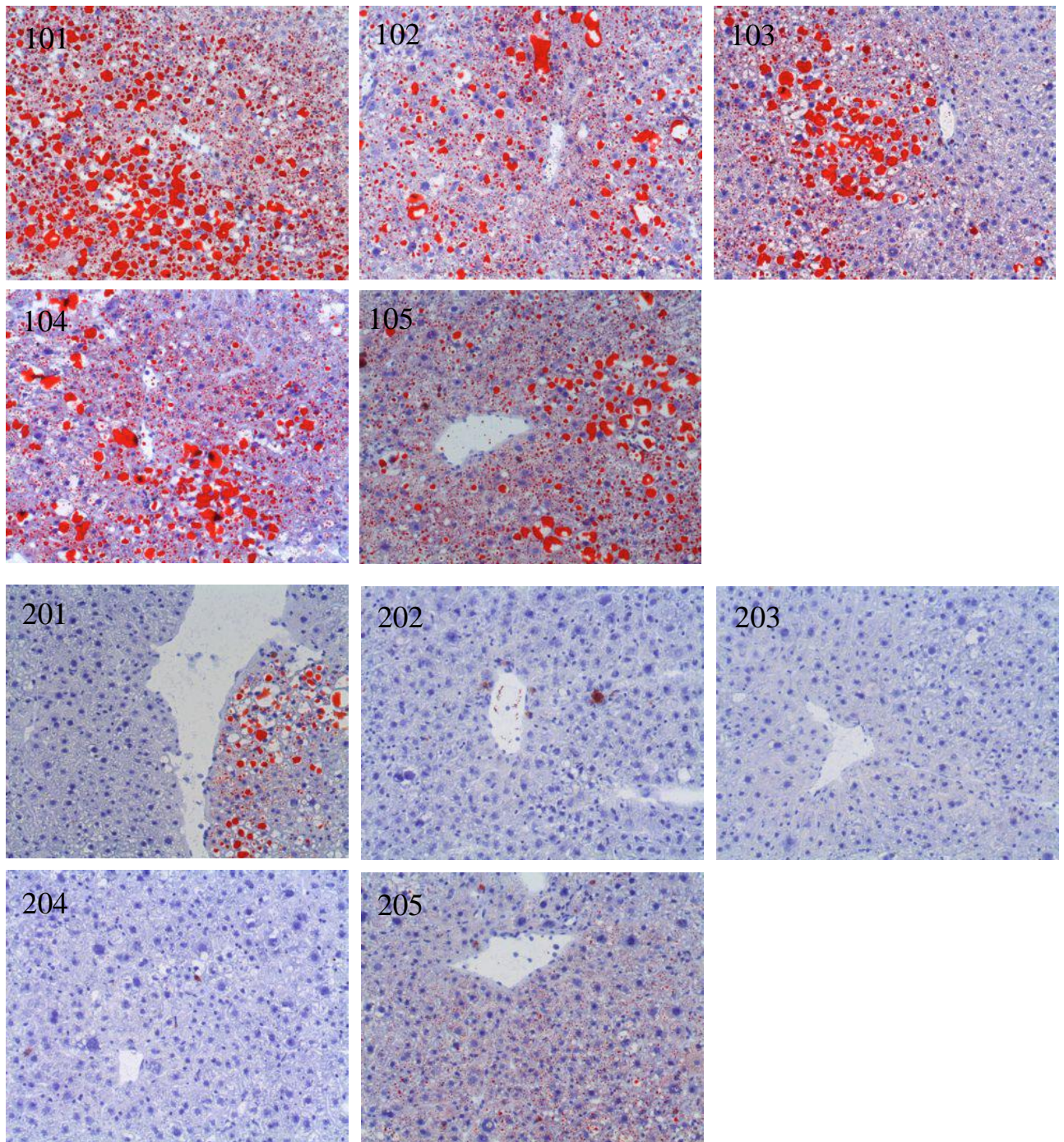


Fig.11. Histopathological changes (Oil red stain) $\times$ 200 of NASH model mice fed Vehicle (101~105) and Betaine (201~205) for 3 weeks.

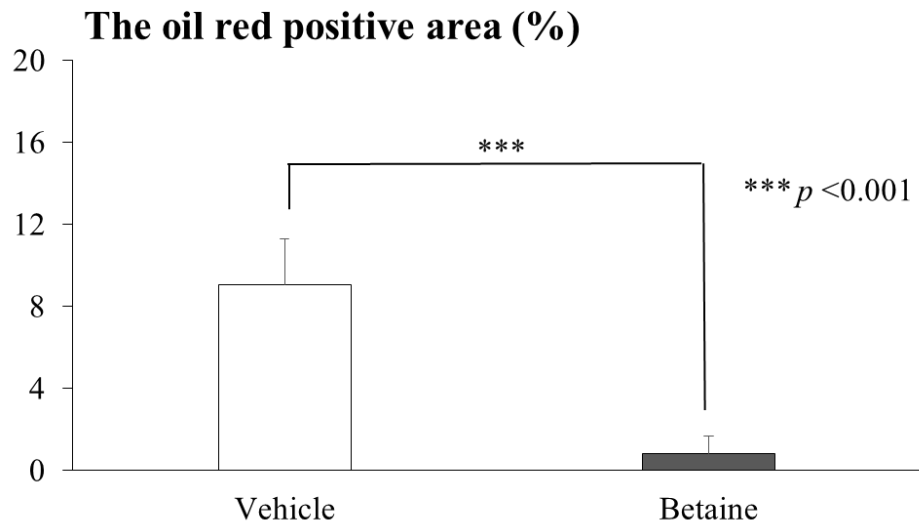


Fig.12. The oil red positive area revealed by graphic.

Each value represents the mean for measurements carried out on five mice, and the standard deviation is represented by vertical bars. Significantly different ( $p < 0.001$ ) was determined by the Student's t-test.

## 4. 考察

本研究では、ビートベタインの NASH モデルマウスへの影響を検討した。

血液生化学検査および肝臓中 GSH 量の測定結果に関しては、Vehicle 群と Betaine 群の間に有意な差は認められなかった。最近の研究で、高脂肪食と四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 投与により肝臓の線維症を引き起こしたラットにおいても、2% ベタイン投与による肝臓中の GSH や GPx に対する顕著な影響はみられていない<sup>25)</sup>。肝臓中の GSH は、肝障害によりメチオニンサイクルが正常に機能しなくなることで低下し、肝臓の代謝機能の異常を示す。したがって、本研究における結果は、NASH 初期段階では肝臓が正常に機能していることを示している。今回 Betaine 群では、Vehicle 群と比較して肝重量体重比の有意な上昇が認められた<sup>26)</sup>。また、HE 染色およびオイルレッド染色による病理組織学的解析の結果、Betaine 群の肝細胞では脂肪沈着、膨化および壊死の抑制が観察され、これらには統計的有意差が認められた<sup>26)</sup>。これにより、ベタイン投与による脂肪肝の改善効果および NASH 予防効果が示唆される。また Betaine 群における肝重量体重比の増加は脂肪沈着によるものでなく、NASH 予防による肝細胞の正常化を反映している可能性が考えられる。Kwon ら (2009 年) は高脂肪食と共にベタインをラットに投与すると、肝臓での酸化ストレスや脂肪沈着が抑制されることを認めている<sup>27)</sup>。また肝臓線維症ラットにおいて、ベタイン摂取により肝臓中中性脂肪の増加を抑制し、酸化ストレスや炎症の抑制、肝星細胞を活性化し線維症の発症を抑制したことが報告されている<sup>25)</sup>。

哺乳類において肝臓が含硫アミノ酸代謝の中心とすると、肝臓におけるトランススルフェーション連鎖反応の第一段階でメチオニンアデノシルトランスフ

エラーゼ (methionine adenosyltransferase ; MAT) によって、メチオニンと ATP から S-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine ; SAM) を形成する<sup>28)</sup>。SAM は基本的な生物学的メチル基供与体で、ポリアミン合成に用いられるアミノプロピル基の前駆体であり、GSH 合成におけるシステイン供与体である<sup>29)</sup>。SAM および GSH は共にヒドロキシラジカルのスキャベンジャーであり、SAM が最も効果的であるといわれている<sup>30)</sup>。近年 Kathirvel ら (2010 年) は、ベタインがマウスにおける血清ホモシステイン濃度の減少や、肝臓の SAM 濃度上昇により NAFLD を抑制すると報告した<sup>31)</sup>。ベタインは、肝臓内のメチオニンサイクルにおいて、ベタイン-ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼ (betaine-homocysteine S-methyltransferase ; BHMT) として、ホモシステインからメチオニンへの再メチル化を促進し、メチオニンや生体内で核酸やタンパク質、脂質等の合成の重要な役割を担っている肝臓中の SAM 濃度を上昇させるという報告や、トランススルフィレーション経路におけるシステインからタウリンへの異化作用を減少させるという報告がある<sup>32-34)</sup>。このタウリン産生阻害が、肝臓での GSH 合成を強化すると示唆されている<sup>35-37)</sup>。また初期の研究で、メチオニン、コリンまたは SAM の含有が、エタノール食を給餌されたラットにおける肝臓の脂肪の浸潤を防ぐことが報告された<sup>38-40)</sup>。さらに、ベタインをアルコールで惹起された脂肪性肝炎のラットに投与すると SAM の増加を招き、脂肪肝を抑制することも明らかになっている<sup>33)</sup>。アルコール性脂肪性肝炎のメカニズムは NASH とは異なるが、脂肪酸代謝の乱れ<sup>41,42)</sup>、異常なサイトカイン産出<sup>43)</sup>、酸化ストレスの生成<sup>44-46)</sup> といった機構的要因は共通しており、これらは NASH 病態進行の原因を探るために重要な知見である。したがってベタインの抗酸化活性効果は、肝臓中の含硫物質の代謝に関連していることが示唆される<sup>47,48)</sup>。

さらに、ベタインはホスファチジルコリンの形成において、ホスファチジルエタノールアミンへメチル基を寄与する SAM の肝臓レベルの上昇により、ホスファチジルコリン合成を増加させるとの報告もある<sup>49)</sup>。ベタイン投与が、VLDL の主要な構成成分であるホスファチジルコリンを増加させることにより VLDL 合成を増加させると報告されている<sup>50,51)</sup>。しかし、本研究では、ベタイン投与が NASH モデルマウスにおいて、体重や血清中性脂肪レベルへの影響を伴わずに脂肪肝を軽減した<sup>26)</sup>。Kathrvel ら (2010 年) は、高脂肪マウスモデルへのベタイン投与が、体重はわずかな減少でありながら内臓脂肪量を有意に減少させたと報告している<sup>31)</sup>。本研究における NASH モデルマウスに対するベタインの脂肪肝調節効果は、VLDL 粒子形成の増加や肝臓からの脂質輸送の増加の結果として、一部を説明できるかもしれない。

本研究の結果によって、ベタイン投与は NASH の発症メカニズムとして提唱されている、Two hit theory における肝臓細胞への中性脂肪の沈着による脂肪肝の発症 (1st hit) を抑制したが、酸化ストレス (2nd hit) の低減効果は確認できなかった。したがってベタインは、NASH の病態進行初期の予防に効果的であることが示唆される。しかしながら、ベタインのこれらの作用機序については未だ不明な点が多く、さらなる検討が必要である。高炭水化物食による脂肪肝の場合、ベタインは脂質合成に関するステロール調節配列結合タンパク (sterol - regulatory element-binding protein ; SREBP) や、脂肪酸合成酵素 (fatty acid - synthase ; FAS) を介して肝臓の脂肪蓄積を抑制することも報告されている<sup>52)</sup>。今後、これらの遺伝子発現解析を行うことにより、分子レベルでのベタインの作用機序の解明が期待される。



## 第2章

2種のマッシュルーム (*Agaricus bisporus*) の *in vitro* および  
*in vivo* 試験における腸内発酵および脂質代謝改善効果

## 1. 緒言

ヒトの腸内では 500 種類以上の細菌がフローラを形成しており，それらは未消化の糖質やタンパク質，脂質等を基質として代謝し，エネルギーを獲得して腸内フローラを維持している<sup>1)</sup>。しかし大腸菌やウェルシュ菌などの腸内有害菌の代謝産物であるアンモニアやインドール，フェノール類などは，腸管自体に障害を与えるだけでなく，一部は吸収されて，がん<sup>2)</sup>，高血圧および動脈硬化<sup>3)</sup>などの原因となる危険性が指摘されており，いずれも腸内腐敗産物の指標として考えられている。例えば，便の悪臭の原因となるインドールは，トリプトファンから生産され腸管から吸収された後に，肝臓においてインドキシル，さらにインドキシル硫酸に代謝され尿中に排泄されるが，それが膀胱がん等のプロモーターとなりうることが報告されている<sup>4-6)</sup>。またアンモニアは，肝性脳症など肝臓における細胞傷害の起因となる<sup>7,8)</sup>。

難消化性糖類の一つである食物繊維は，消化管で消化，吸収されることなく大腸まで運ばれ，ビフィズス菌などの有用菌がそれを選択的に資化するため増殖促進作用をもたらす。それら有用菌により生成される短鎖脂肪酸（酢酸，プロピオン酸，酪酸）は腸内の pH を低下させ（～pH 6.0），大腸菌やウェルシュ菌などの有害菌の生育を抑制し，有害物質である二次胆汁酸や腐敗化合物の生成を抑制する他，Ca や Mg 等のミネラル吸収を促進することがわかっている<sup>9,10)</sup>。

キノコ類には，セルロース，ヘミセルロース，リグニン，β-グルカンやキチンなどの食物繊維が多く含まれており，以前の研究ではシイタケ (*Lentinus edodes*)，エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の食物繊維がラットの盲腸内短鎖脂肪酸の生成量増加を促し，血漿中コレステロール値を低下させたという報告がされてい

る<sup>11)</sup>。また、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) には豊富な食物繊維の他、葉酸、ビタミン C, B<sub>12</sub>, D, ポリフェノールなどの抗酸化物質が含まれているため、血糖値の低下やコレステロールの低下、抗炎症作用などの効果をもつ可能性が示唆されている<sup>12-14)</sup>。また以前の研究で、ホワイトマッシュルームは糖尿病と高コレステロール血症のラットにおいて、血糖値と血中コレステロールを低下させると報告されている<sup>15-17)</sup>。Fukushima ら (2000 年) は、ブラウンマッシュルーム繊維がラットの血中コレステロールを低下させ、脂質代謝を改善することを明らかにしている<sup>18)</sup>。しかしながらマッシュルーム全体の健康機能性や作用機序などはまだ明らかでない。

また最近では、北海道十勝地域においてもマッシュルームが生産されており、「とちまッシュ」<sup>19)</sup>として全国に広く流通している。地域の特色を活かし、ばん馬の敷き藁として用いた後の十勝産小麦の藁を培地として用いている。十勝産マッシュルームの機能性評価は未だ行われていないが、新規な知見によって他の産地との差別化が期待できる。

本研究では、十勝産ホワイトマッシュルームおよびブラウンマッシュルーム粉末について、*in vitro* および *in vivo* 試験により、腸内発酵および脂質代謝への影響を検討した。

## 2. 実験方法

### 1. 実験試料

マッシュルームは、とちまきマッシュ（ブラウン種，ホワイト種；鎌田商事株式会社，香川，日本）を用いた。2種類のマッシュルームをそれぞれ通風乾燥器で70°C，72時間乾燥させ，パワーカッティングミルで粉末化した。ブラウンマッシュルームおよびホワイトマッシュルーム粉末（ブラウン；BM，ホワイト；WM）の一般成分組成は，AOAC法に従いそれぞれ総食物繊維（AOAC 991.43），不溶性食物繊維（AOAC 991.43），水溶性食物繊維（AOAC 991.43），タンパク質（AOAC 920.87），脂質（AOAC 920.85），水分（AOAC 925.10），灰分（AOAC 923.03）である。成分表をTable 1に示す。

Table 1. Compositions of mushroom powders.

	Energy (kcal/100g)	Moisture (%)	Protein (%)	Fat (%)	Carbohydrate (%)			Ash (%)	
					Sugar	Dietary fiber			
						Insoluble	Soluble		Total
WM powder	302	2.6	33.0	4.4	16.3	30.4	2.4	32.8	10.9
BM powder	296	1.4	37.7	4.5	7.2	36.2	1.8	38.0	11.2

CN, control diet; WM, white mushroom; BM, brown mushroom.

## 2. *in vitro* 試験

### 1) 培養条件

2種のマッシュルーム粉末を炭素源とし、ジャーファーメンター（微生物培養装置 BMJ-01NC；エイブル株式会社，東京，日本）を用いて *in vitro* 発酵試験を行った。窒素源が全培養液の 0.8%となるように，非選択培地（ニュートリエントブロス；Difco Laboratories, MI, USA）を培養槽に加えて 121°C で 15 分間滅菌した。ジャーファーメンターに添加する腸内細菌は，豚の新鮮な糞便（長内畜産株式会社，帯広，日本）を用いた。糞便を滅菌生理食塩水で 10 倍に希釈して，固形物を取り除いたろ液を細菌液とし，全培養液の 2%となるように培養槽に加えた。試料は，コントロールとしてセルロース（SIGMA-ALDRICH, MO, USA）を用いた。2種類のマッシュルーム粉末は，それぞれ炭素源が全培養液の 3%となるように加えた。ジャーファーメンターの設定条件は Table 2 のようにし，48 時間嫌気培養を行った。培養液のサンプリングは培養開始から 0, 12, 24, 48 時間において行い，滅菌した 2 ml 容マイクロチューブに採取した。また，サンプリング時に培養液の pH を記録した。細菌叢分析用の培養液は 4°C で保存し，短鎖脂肪酸および腸内腐敗物質の分析用サンプルは 10,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離し，上清を使用時まで -30°C で保存した。

Table 2. Conditions of the microbial cultivation.

Temperature	37°C
Stirring speed	160 rpm
Flow rate of CO <sub>2</sub>	0.4 mL/min
Lower limit of pH	pH5.5

## 2) 腸内細菌叢分析

それぞれの時間においてサンプリングした培養液に、滅菌生理食塩水を加えることによって 10 倍希釈系列を作成し、細菌叢を解析した。Coliform の測定は、EMB 寒天培地（栄研化学株式会社，東京，日本）で 37°C，24 時間，Anaerobe の測定は BL 寒天培地（栄研化学株式会社）にウマ脱繊維血液を添加した培地で 37°C，48 時間嫌気培養した。Lactobacillus の測定は，Rogosa 寒天培地（関東化学株式会社，東京，日本）に氷酢酸を添加した培地で 37°C 48 時間嫌気培養，Bifidobacterium の測定は，TOS プロピオン酸寒天培地（ヤクルト薬品工業株式会社，東京，日本）で 37°C，72 時間嫌気培養し，それぞれ平板塗抹法を用いた。また，Cl. perfringens の測定は，OPSP 寒天培地（関東化学株式会社）に抗生物質として，サプリメント A（スルファジアジンナトリウム含有）とサプリメント B（オランダマイシン，ポリミキシン B 含有）を添加した培地で，Lactic acid bacteria の測定には，M.R.S.寒天培地（関東化学株式会社）で 37°C，48 時間混釈培養法を用いた。また嫌気培養にはアネロパック・ケンキシシステム（三菱ガス化学，東京，日本）を用いた。培養後，各培地で形成されたすべてのコロニー数（Colony Forming Units ; CFU）を計測し，測定値の対数を求めた<sup>19-21)</sup>。

## 3) 短鎖脂肪酸分析

盲腸の内容物約 1 g を滅菌生理食塩水で溶かして 10 ml とし，その混濁液を 10,000 rpm，4°C で 10 分間遠心分離し，得られた上清 0.5 ml に 0.4 N 過塩素酸を 25 µl 加え，攪拌後に 10,000 rpm，4°C で 10 分間遠心分離した。得られた上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用ディスポーザブルフィルター（東ソー株式会社，東京，日本）に通し，調整試料を得た。この試料の 25 µl を HPLC（LC-10AD；島津製作所，京都，日本）に供し，BTB ポストカラム法<sup>22)</sup>により短鎖脂

肪酸（酢酸，プロピオン酸，酪酸）を定量した。

#### 4) アンモニア分析

培養液中のアンモニア窒素濃度は，アンモニア測定キット（アンモニア-テストワコー；和光純薬工業株式会社，大阪，日本）を用いて定量した<sup>23)</sup>。

### 3. *in vivo* 試験

#### 1) 実験動物および食餌飼料

実験動物は，7週齢の Fischer 系雄性ラット（日本チャールズ・リバー株式会社，横浜，日本）15匹を用いた。飼育条件は，12時間の明暗周期，温度  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度  $60\pm 5\%$ とした。ラットは，1匹ずつプラスチックケースに分けて個別に飼育した。1週間の予備飼育による順化期間の後に3つの投与群に分け，各群5匹として実験食の投与期間を4週間設けた。実験食は AIN93G（日本クレア株式会社，東京，日本）を基準食として用い，これにマッシュルーム粉末を食物繊維が5%となるように添加し，成分調製をして，ホワイトマッシュルーム添加食群（WM群）とブラウンマッシュルーム添加食群（BM群）とした。それぞれの食餌組成を Table 3 に示す。水と食餌は自由摂取とし，摂食量は毎日，体重は毎週測定した。毎週採血の12時間前に絶食し，1 ml の採血を行い，血液は1.5 ml 容マイクロチューブに入れ，2時間室温で静置したのち7,000 rpm で15分間遠心分離し，上清を分析まで $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。投与実験の終了後，ラットはネンブタール（sodium pentobarbital, Abbott Laboratories, IL, USA）により麻酔（40 mg/kg 体重）をした後腹腔を切開し肝臓，盲腸を摘出した。このうち肝臓は冷生理食塩水（9 g NaCl/l）で洗浄，重量を測定し，分析まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。盲腸は内容物と盲腸壁に分け，それぞれの重量を測定し，内容物約1 g を滅菌生理食塩水で10 ml

とし、その懸濁液の一部を短鎖脂肪酸分析用に-30°Cで、細菌叢分析用に4°Cで保存した。実験動物の取り扱いについては、Guide of Care and Use of Laboratory (1985年)に従った<sup>24)</sup>。

Table 3. Compositions of experimental diets (%).

	CN	WM	BM
Casein	20	15	15
L-cystine	0.3	0.3	0.3
Soy oil	5	4.4	4.4
Mineral	3.5	3.5	3.5
Vitamin	1	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
t-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Sucrose	10	10	10
Cellulose	5	-	-
WM powder	-	15.3	-
BM powder	-	-	13.2
Corn starch	54.9486	50.2486	52.3486

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.



## 2) 腸内細菌叢分析

盲腸内容物懸濁液を、滅菌生理食塩水を用いて 10 倍希釈系列を作成し、細菌叢を解析した。Coliform の測定は、EMB 寒天培地（栄研化学株式会社，東京，日本）で 37°C，24 時間，一般嫌気性菌の測定は BL 寒天培地（栄研化学株式会社）にウマ脱繊維血液を添加した培地で 37°C，48 時間嫌気培養した。*Lactobacillus* の測定は，Rogosa 寒天培地（関東化学株式会社，東京，日本）に氷酢酸を添加した培地で 37°C，48 時間嫌気培養し，*Bifidobacterium* の測定は，TOS プロピオン酸寒天培地（ヤクルト薬品工業株式会社，東京，日本）で 37°C，72 時間嫌気培養し，それぞれ平板塗抹法を用いた。また，*Cl. perfringens* の測定は，OPSP 寒天培地（関東化学株式会社）に抗生物質として，サプリメント A（スルファジアジンナトリウム含有）とサプリメント B（オランダマイシン，ポリミキシン B 含有）を添加した培地で，Lactic acid bacteria の測定には，M.R.S.寒天培地（関東化学株式会社）で 37°C，48 時間混釈培養法を用いた。また嫌気培養にはアネロパック・ケンキシシステム（三菱ガス化学，東京，日本）を用いた。培養後，各培地で形成されたすべてのコロニー数を計測し，測定値の対数を求めた<sup>19-21)</sup>。

## 3) 盲腸内 pH および短鎖脂肪酸分析

盲腸内容物約 1 g を滅菌生理食塩水で希釈し 10 ml とし，pH メーター（SevenCompact，メトラー・トレド株式会社，東京，日本）により pH を測定した。この後，短鎖脂肪酸の分析を行った。盲腸内容物の混濁液を 10,000 rpm，4°C で 10 分間遠心分離し，得られた上清 0.5 ml に 0.4 N 過塩素酸を 25  $\mu$ l 加え，攪拌後に 10,000 rpm，4°C で 10 分間遠心分離した。得られた上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用ディスポーザブルフィルター（東ソー株式会社，東京，日本）に通し，調整試料を得た。この試料の 25  $\mu$ l を HPLC（LC-10AD；島津製

作所，京都，日本）に供し，BTB ポストカラム法<sup>22)</sup>により短鎖脂肪酸（酢酸，プロピオン酸，酪酸）を定量した。

#### 4) 血清コレステロール分析

総コレステロール，HDL コレステロールの測定は酵素法（TDX システム；Abbott Laboratories, IL, USA）により行った。総コレステロールと HDL-コレステロール濃度の差を VLDL+HDL+LDL-コレステロール濃度とした。

#### 5) 肝臓コレステロールおよび糞便中ステロール分析

肝臓および糞中の全脂質は，クロロホルム-メタノール混合溶液（2：1，v/v）で抽出した。その後 Matsubara ら（1990 年）の方法<sup>25)</sup>によって，中性ステロールアセテート誘導体を得てガスクロマトグラフィー（GLC）（GC-14A；島津製作所）に供した。中性ステロールの定量は，DB17 キャピラリーカラム（0.25 mm×30 mm；J&W scientific, CA, USA）を用いて窒素を移動相とし，水素炎イオン化検出機で分析を行った。温度条件はカラム 260°C，試料注入部および検出部を 300°C とした。

糞中の胆汁酸の定量は，Grundy ら（1965 年）の方法<sup>26)</sup>に従って行った。リトコール酸，デオキシコール酸，ケノデオキシコール酸およびコール酸を標準物質とし，GLC の条件は上記と同様にし，カラム温度のみ 270°C とした。

#### 4. 統計分析

それぞれのデータは平均値±標準偏差で表した。データ間の有意差検定は Tukey-Kramer test の多重比較検定法にて行い， $p < 0.05$  を有意差とした。

### 3. 結果

#### 1. *in vitro* 試験

##### 1) 培養液 pH

培養液の pH は培養開始から 12 時間以降, cellulose 群と比較して, BM, WM 添加区で有意に低い値を維持していた ( $p < 0.05$ ) (Fig.1)。

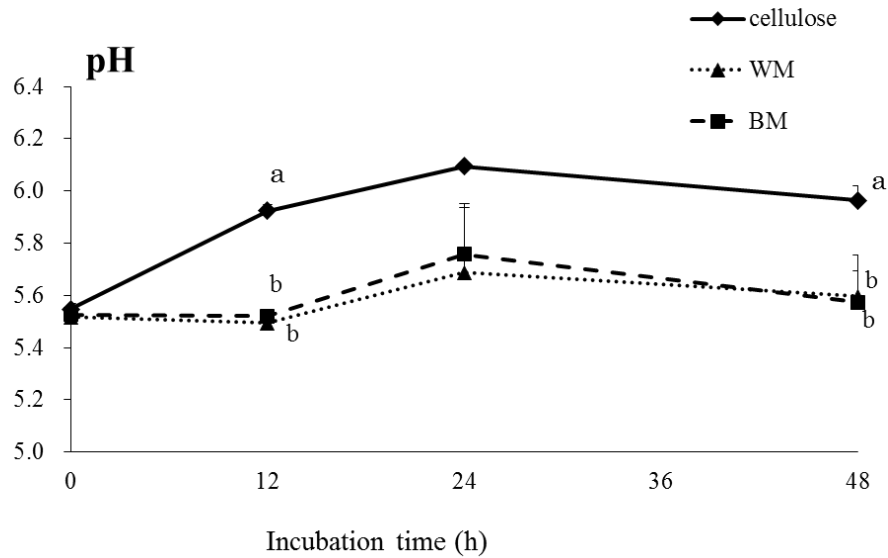


Fig.1. The pH changes during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means  $\pm$  standard deviation ( $n=5$ ). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 2) 培養液中細菌叢

*Cl. perfringens* には有意な差は認められなかったが、Coliform は培養開始から 24 時間以降、cellulose 群に対し WM 群で有意な減少がみられ ( $p < 0.05$ )、48 時間後では、BM および WM 群で有意に減少した ( $p < 0.05$ )。Anaerobe は、培養開始 12 時間以降、cellulose 群に対して BM 群において有意な増加を示した ( $p < 0.05$ )。*Lactobacillus* は培養開始から 12 時間後に cellulose 添加群に比べて BM 群で有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ ) (Fig.2~7)。

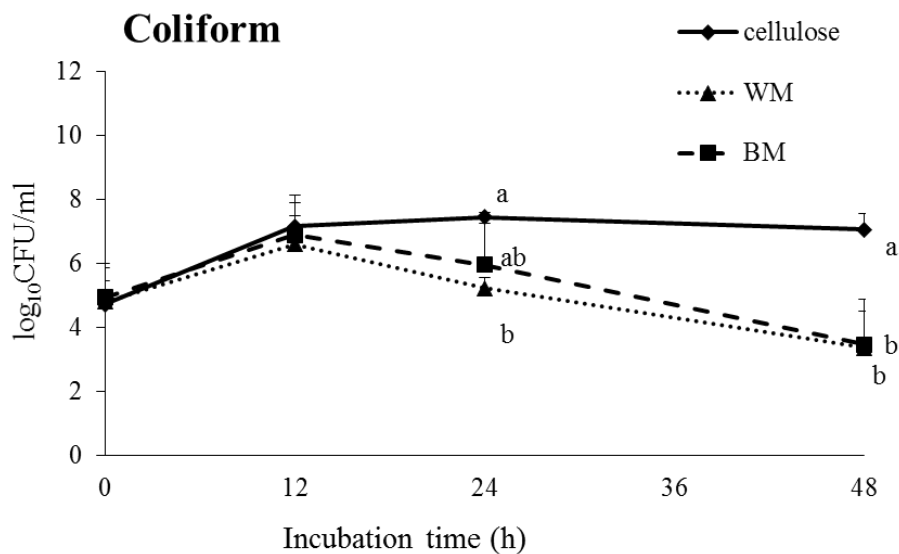


Fig.2. Coliform levels during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

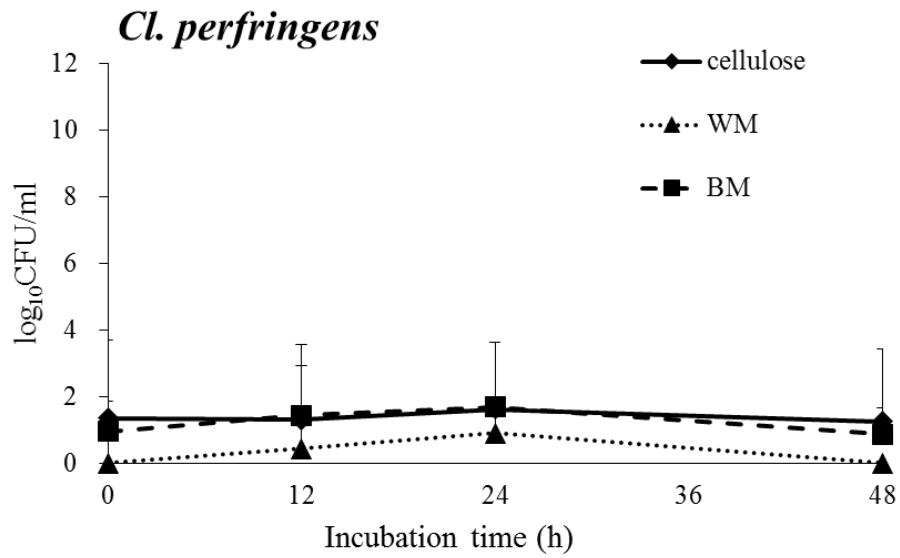


Fig.3. *Cl. perfringens* levels during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5).

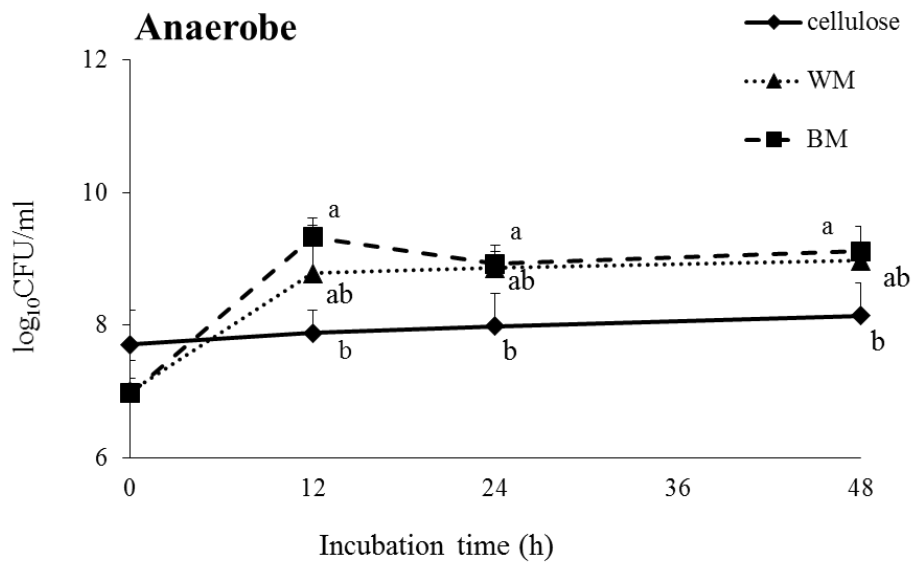


Fig.4. Anaerobe levels during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

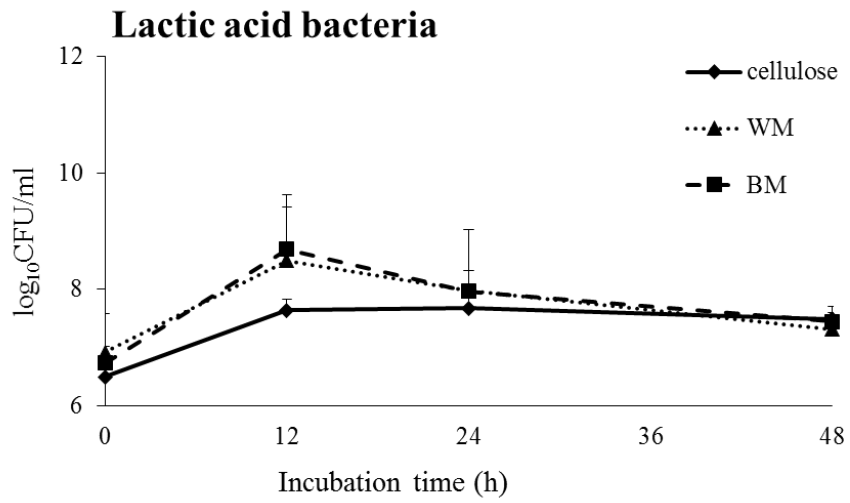


Fig.5. Lactic acid bacteria levels during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5).

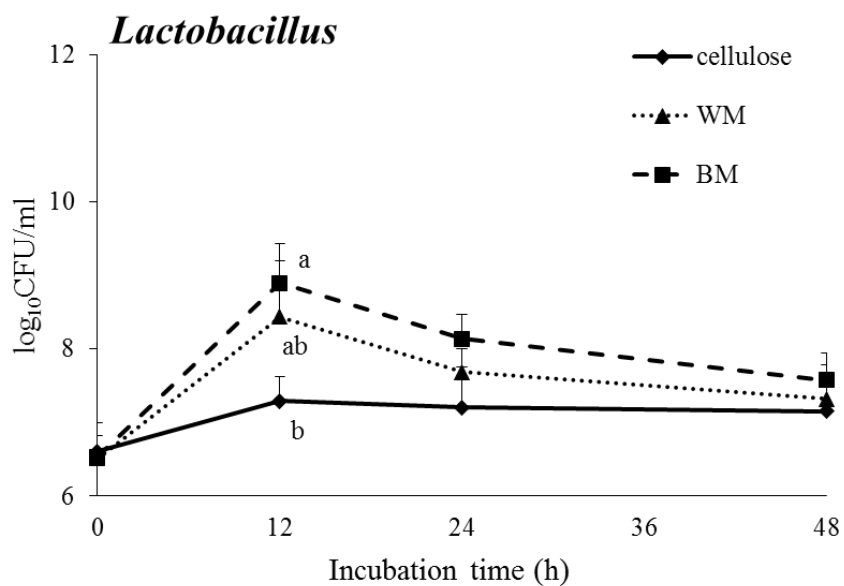


Fig.6. *Lactobacillus* levels during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.



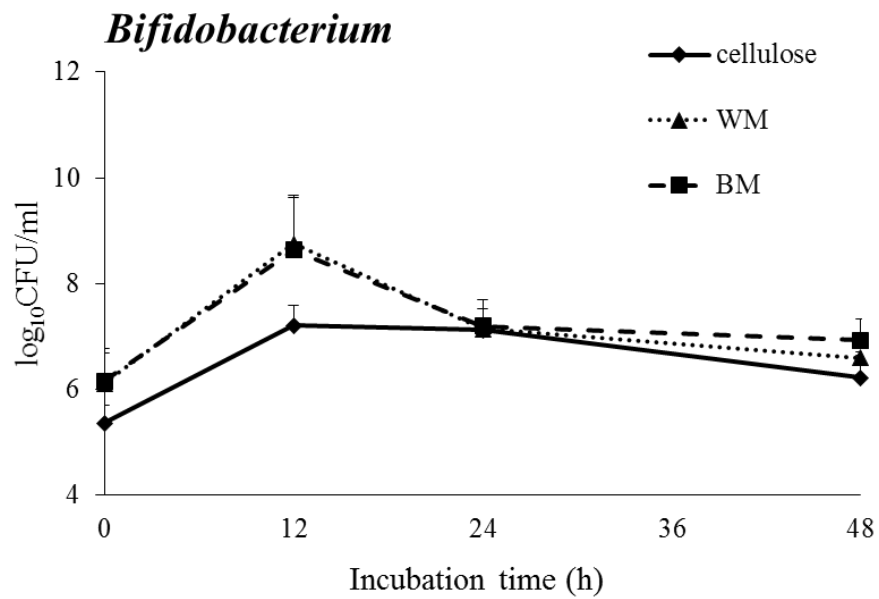


Fig.7. *Bifidobacterium* levels during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5).

### 3) 培養液中短鎖脂肪酸濃度

総短鎖脂肪酸濃度は、培養開始から 12, 24 時間後において BM および WM 群で、cellulose 群と比較して有意に高い生成量を示した ( $p < 0.05$ )。そのうち酪酸生成量が、培養 12 時間以降、cellulose 群に比べて BM, WM 群で有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。酢酸とプロピオン酸生成量においては有意な差は認められなかった。(Fig.8~11)

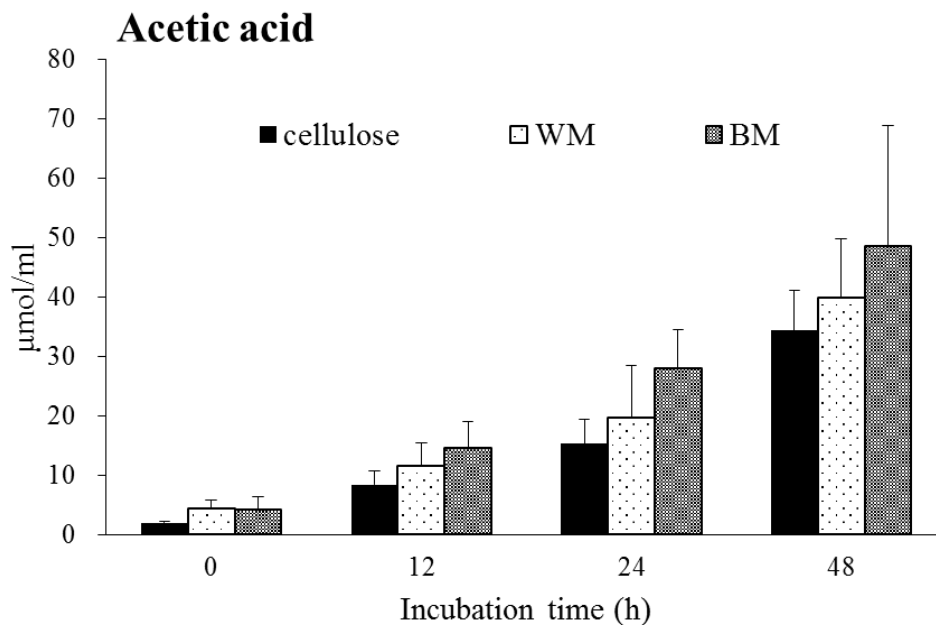


Fig.8. Acetic acid concentrations during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means  $\pm$  standard deviation (n=5).

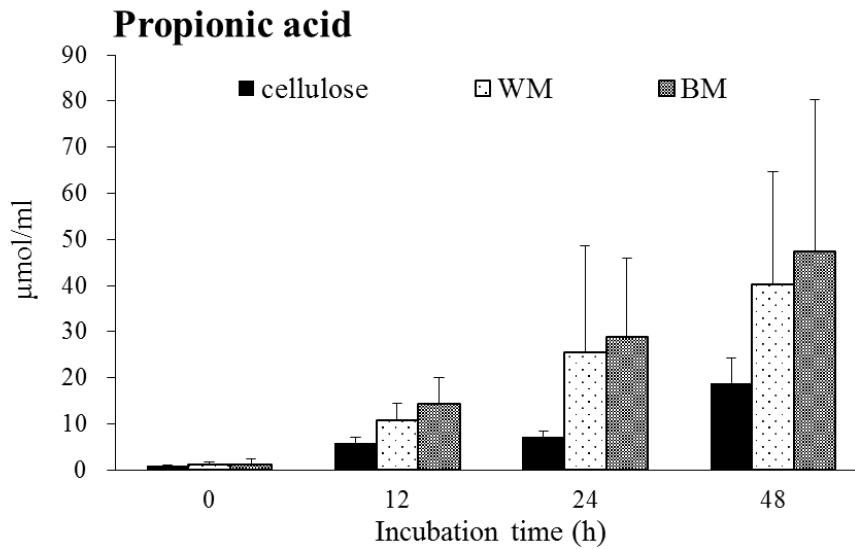


Fig.9. Propionic acid concentrations during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5).

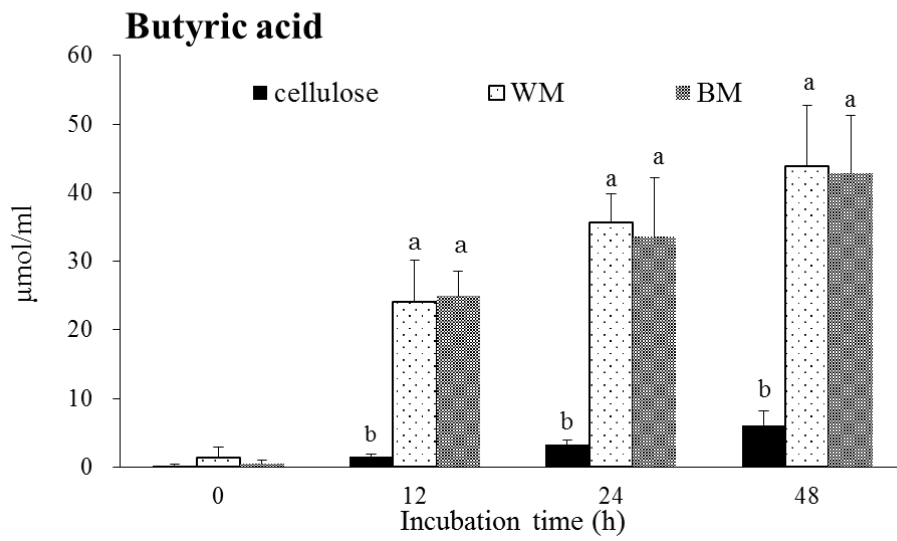


Fig.10. Butyric acid concentrations during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

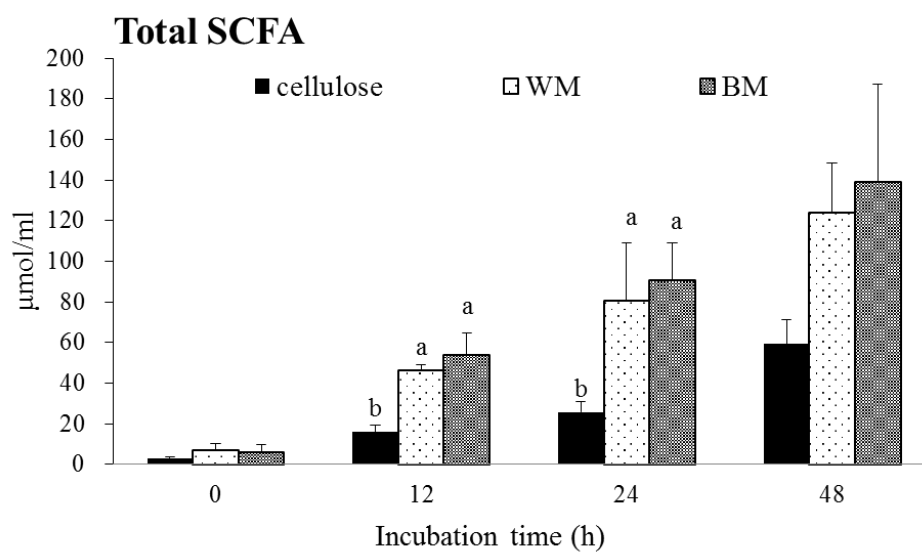


Fig.11. Total SCFA concentrations during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

#### 4) 培養液中アンモニア濃度

アンモニア濃度は、培養開始から 48 時間後に、cellulose 群に比べて WM 群において有意な減少がみられた ( $p < 0.05$ ) (Fig.12)。

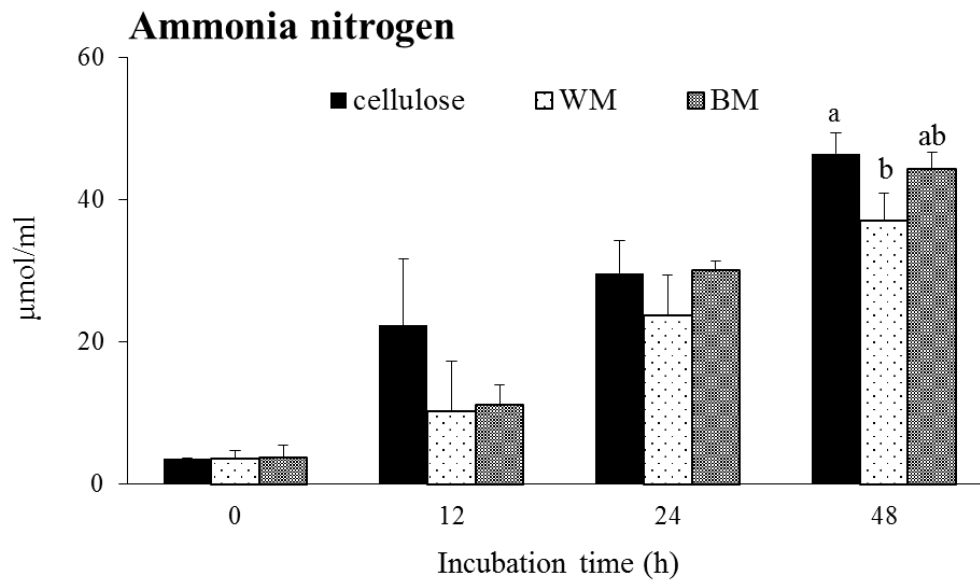


Fig.12. Ammonia nitrogen concentrations during fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, WM, BM powder.

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means

(a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 2. *in vivo* 試験

### 1) 体重, 摂取量および肝臓重量

体重や摂食量, 摂食効率および肝臓重量には有意な差は認められなかった。糞重量において CN 群と比較し BM 群で有意に増加し ( $p < 0.05$ ), 盲腸重量は WM 群が CN 群と比較して有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Table 4)。

Table 4. Body weight, feed intake, liver weight, cecal weight, and fecal weight in rats fed a diet supplemented with mushroom powders.

	CN	WM	BM
Initial body weight (g)	175±6	174±7	175±9
Final body weight (g)	227±9	235±12	231±12
Body weight gain (g)	51.6±5.5	60.8±6.7	56.5±8.5
Feed intake (g)	372±24	350±8	352±9
Feed efficiency	0.14±0.01	0.17±0.01	0.16±0.04
Liver weight (g)	8.03±0.51	8.67±0.83	8.96±0.22
Cecal weight (g)	2.51±0.68 <sup>b</sup>	6.70±2.46 <sup>a</sup>	3.80±0.61 <sup>b</sup>
Fecal weight (wet g/day)	1.00±0.17 <sup>b</sup>	1.08±0.25 <sup>ab</sup>	1.38±0.23 <sup>a</sup>

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet. Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 2) 血清コレステロール濃度

血清中総コレステロール濃度，HDL-コレステロール濃度はすべての群間で有意な差は認められなかったが，VLDL+IDL+LDL-コレステロール濃度は WM 群が CN 群に対して有意に減少した ( $p < 0.05$ )。また，アテローム性動脈硬化指数は BM および WM 群が CN 群と比較して有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (Table 5)。

Table 5. Blood lipid profiles in rats fed a diet supplemented with mushroom powders.

	CN	WM	BM
Total cholesterol (mmol/L)	1.68±0.27	1.58±0.03	1.65±0.06
HDL-cholesterol (mmol/L)	0.41±0.07	0.43±0.02	0.44±0.02
VLDL+IDL+LDL-cholesterol (mmol/L)	1.34±0.18 <sup>a</sup>	1.15±0.04 <sup>b</sup>	1.22±0.05 <sup>ab</sup>
Triglyceride (mmol/L)	1.29±0.44	0.95±0.24	1.08±0.14
Atherosclerosis index	3.15±0.06 <sup>a</sup>	2.65±0.16 <sup>b</sup>	2.79±0.11 <sup>b</sup>

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.



### 3) 肝臓コレステロール濃度および糞便ステロール濃度

肝臓中の全脂質量には有意な差は認められなかったが、コレステロール濃度においては、WM および BM 群ともに CN 群と比較して有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (Table 6)。糞中の全脂質量には有意な差は認められなかったが、CN 群と比較してコプロスタノール濃度は BM 群が有意に減少し ( $p < 0.05$ )、WM 群が減少傾向を示した ( $p = 0.063$ )。コレステロール濃度は、CN 群と比較して、BM 群で有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Table 7)。胆汁酸濃度は、コール酸において BM および WM 群で CN 群と比較して有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (Table 8)。

Table 6. Liver total lipid and cholesterol concentrations in rats fed a diet supplemented with mushroom powders.

	CN	WM	BM
Total lipid (mg/g of wet liver)	22.2±7.5	18.5±5.3	18.6±1.7
Cholesterol (μmol/g of wet liver)	1.61±0.61 <sup>a</sup>	0.71±0.42 <sup>b</sup>	0.44±0.39 <sup>b</sup>

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

Table 7. Fecal total weight, cholesterol and coprostanol concentrations in rats fed a diet supplemented with mushroom powders.

	CN	WM	BM
Total lipid (mg/feces/day)	14.8±5.6	21.3±9.6	29.2±17.5
Cholesterol (μmol/feces/day)	0.96±0.16 <sup>b</sup>	1.09±0.24 <sup>ab</sup>	1.32±0.22 <sup>a</sup>
Coprostanol (μmol/feces/day)	1.95±0.44 <sup>a</sup>	1.23±0.52 <sup>ab</sup>	1.19±0.42 <sup>b</sup>
Neutral sterol (μmol/feces/day)	2.91±0.42	2.29±0.53	2.43±0.57

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

Table 8. Fecal bile acid concentrations in rats fed a diet supplemented with mushroom powders.

	CN	WM	BM
Lithocholic acid ( $\mu\text{mol}/\text{feces}/\text{day}$ )	0.41 $\pm$ 0.21	0.33 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.15
Deoxycholic acid ( $\mu\text{mol}/\text{feces}/\text{day}$ )	0.10 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.07
Chenodeoxycholic acid ( $\mu\text{mol}/\text{feces}/\text{day}$ )	0.0252 $\pm$ 0.0155	0.0310 $\pm$ 0.0519	0.0081 $\pm$ 0.0074
Cholic acid ( $\mu\text{mol}/\text{feces}/\text{day}$ )	0.20 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.05 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
Total bile acid ( $\mu\text{mol}/\text{feces}/\text{day}$ )	0.74 $\pm$ 0.38	0.52 $\pm$ 0.20	0.44 $\pm$ 0.17

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means $\pm$ standard deviation (n=5). Significant differences between means

(a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

#### 4) 盲腸内 pH, 短鎖脂肪酸濃度および盲腸内細菌叢

盲腸内容物の pH は, CN 群と比較して WM 群で有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (Fig.13)。また, 短鎖脂肪酸濃度は酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 総短鎖脂肪酸が CN 群と比較して WM 群で有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Fig.14)。Coliform は, CN 群と比較して BM 群で有意に減少し, WM 群で減少傾向が認められた ( $p = 0.074$ )。Anaerobe は WM 群で CN 群と比較して有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Table 9)。

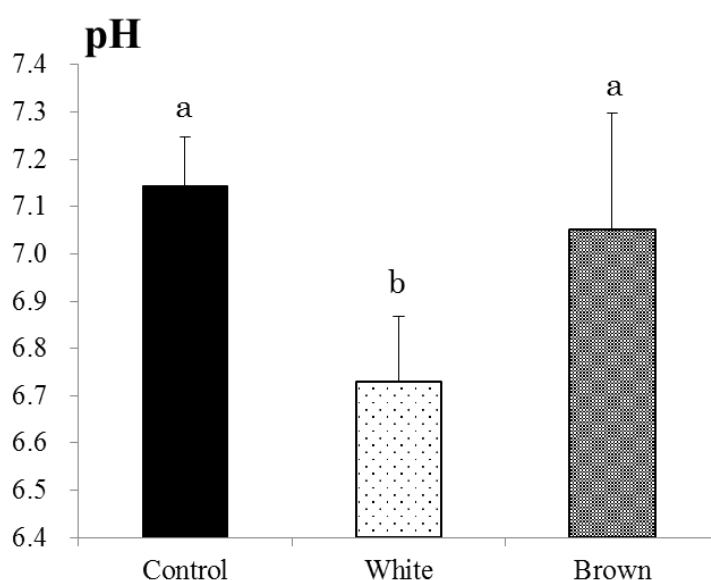


Fig. 13. The pH of cecal contents in rats fed a diet supplemented with mushroom powders.

Values represent mean $\pm$ standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

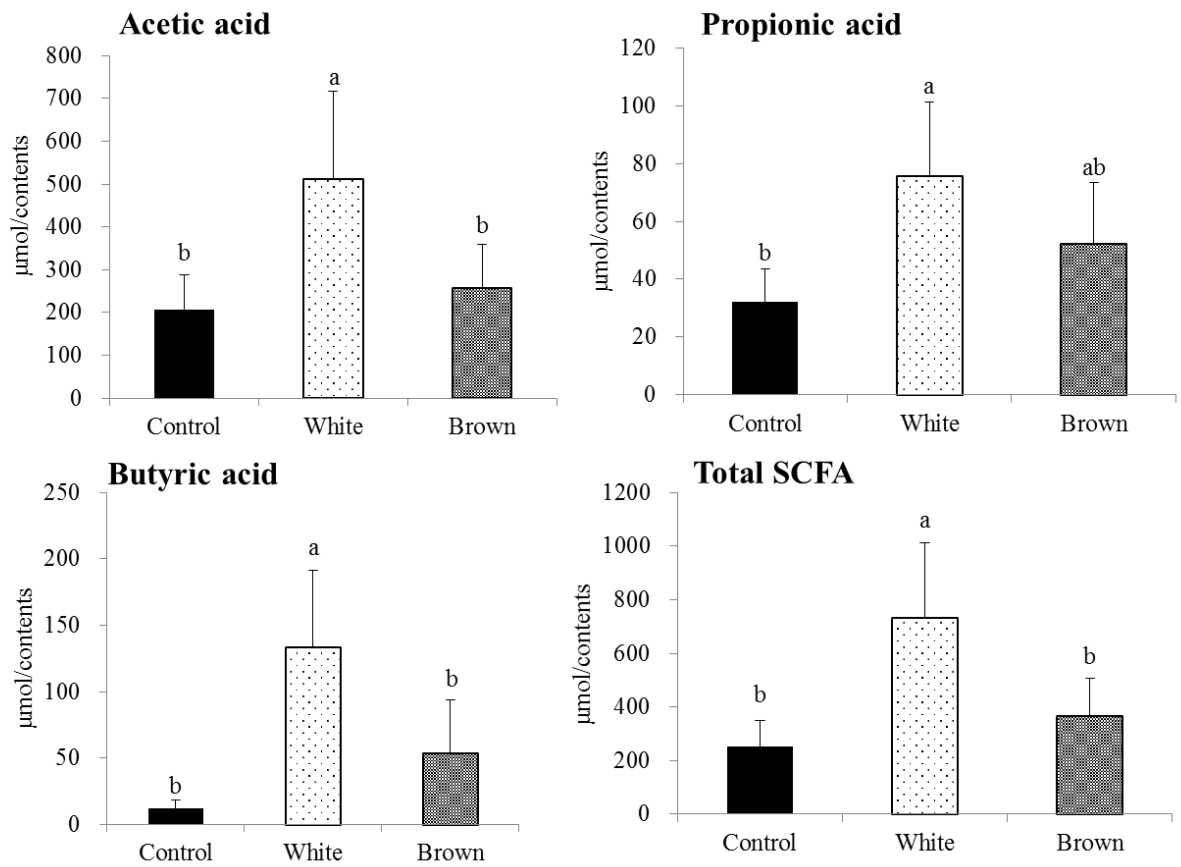


Fig. 14. Cecal acetic acid concentrations in rats fed a diet supplemented with mushroom powders.

Values represent mean  $\pm$  standard deviation ( $n=5$ ). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

Table 9. Cecal bacterial levels in rats fed a diet supplemented with mushroom powders.

	CN	WM	BM
Coliform (log <sub>10</sub> CFU/contents)	7.96 ± 0.41 <sup>a</sup>	6.95 ± 0.81 <sup>ab</sup>	6.81 ± 0.66 <sup>b</sup>
Anaerobes (log <sub>10</sub> CFU/contents)	9.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	10.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	9.1 ± 0.5 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus</i> (log <sub>10</sub> CFU/contents)	7.99 ± 0.97	8.88 ± 0.47	8.39 ± 0.42
<i>Bifidobacterium</i> (log <sub>10</sub> CFU/contents)	8.19 ± 0.44	7.98 ± 0.52	7.80 ± 0.55
Lactic acid bacteria (log <sub>10</sub> CFU/contents)	8.53 ± 0.34	9.61 ± 0.98	8.91 ± 0.45

CN, control diet; WM, white mushroom powder diet; BM, brown mushroom powder diet.

Values represent means ± standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 4. 考察

本研究では、*in vitro* および *in vivo* 試験により、ホワイトマッシュルームおよびブラウンマッシュルーム粉末の腸内発酵および脂質代謝への影響について検討した。

食物繊維の多くは大腸内で腸内細菌による発酵を受け、短鎖脂肪酸（SCFA）や乳酸を生成する。またそれらは、大腸内の pH を低下させることにより二次胆汁酸や腐敗化合物の生成を抑制する<sup>27)</sup>。それにより大腸がんや炎症のリスクの低減につながる<sup>28,29)</sup>。

キノコ類は SCFA 生成量と糞便重量を増加させ、盲腸 pH を下げることで腸内環境改善に有益であると考えられている<sup>30)</sup>。キノコには、不溶性食物繊維であるキチンやβ-グルカンが多く含まれている<sup>31)</sup>。細菌由来のβ-グルカンを4週間投与したラットで、ビフィズス菌の増加と SCFA および乳酸生成量の増加を示したという報告がある<sup>32)</sup>。また Fukushima ら（2000年）はマッシュルーム繊維がコレステロールフリー食を投与したラットにおいてプロピオン酸の産生を増加させたと報告している<sup>18)</sup>。

*in vitro* 試験では、総 SCFA および酪酸生成量において、2種のマッシュルーム両添加区で、培養開始12時間以降著しい増加がみられた。乳酸やコハク酸などの有機酸は有機酸利用性の細菌群により更に代謝されて酢酸やプロピオン酸、酪酸などの SCFA に変換される<sup>33)</sup>。大腸内には乳酸を酪酸に変換する *Megasphaera elsdenii* などの乳酸利用酪酸菌の他、酢酸をプロピオン酸に変換する *Veillonella ratti* や *Selenomonas ruminantium* などが存在することがわかっている<sup>34)</sup>。本研究では、培養開始24時間から48時間にかけて有用菌の増殖はみら

れないが、SCFAは時間経過とともに増加した。この原因として、培養開始12時間で*Lactobacillus*の増加により生成された乳酸がSCFA、とくに酪酸に変換された可能性がある<sup>33)</sup>。2種のマッシュルーム両方の添加区で、培養開始24時間以降、Coliformの著しい増殖抑制が確認された。これはマッシュルームの添加によってAnaerobeと*Lactobacillus*が顕著に増加したことで、SCFAの生成量が増加し、それにより培養液のpHが低下したことによるものと考えられる。

腸管内では、食事由来のアミノ酸が、小腸で粘膜グルタミナーゼやグルタミン酸脱水素酵素、大腸でアデニル酸デアミナーゼにより分解され、また尿素が大腸で大腸菌やウェルシュ菌などの腸内有害菌のもつウレアーゼにより分解されアンモニアが生成される<sup>6, 35)</sup>。本研究では、マッシュルーム添加により、培養開始48時間でアンモニアの生成抑制効果がみられた。培養開始24時間以降、Coliformがマッシュルーム添加区で有意に減少していたことや、SCFA増加に伴うpHの低下によりウレアーゼや脱アミノ酵素などの活性が低下したことが、アンモニア生成の抑制に関与したと考えられる<sup>35)</sup>。

*in vivo*試験においては、4週間のマッシュルーム投与は、ラットの盲腸内においてColiformの顕著な減少やAnaerobeの増加、とくにWM食群で著しいSCFA生成量の増加を与えた<sup>36)</sup>。WM食群ではそれに伴うpHの顕著な低下もみられた<sup>36)</sup>。またWM食群で盲腸重量が増加した。これはWMに含まれる水溶性食物繊維がBMよりも多いため、盲腸内での滞留時間の増加によって盲腸重量が増加したと考えられる。水溶性食物繊維は消化管内でゲル構造を形成し、消化管通過時間が長くなるため、微生物により利用されやすいことが報告されている<sup>37-39)</sup>。

WM群において血中のVLDL+IDL+LDL-コレステロールが顕著に減少し、アテローム性動脈硬化指数もマッシュルーム添加で顕著に低下した<sup>36)</sup>。また、肝



臓中のコレステロールも著しく低下し、とくに **BM** 群で糞中へのコレステロール排泄も顕著であった<sup>36)</sup>。Fukushima ら (2000 年) は、ブラウンマッシュルーム繊維がラット肝臓における LDL レセプターの遺伝子発現を上昇させると報告している<sup>18)</sup>。本研究でも同様に、体内での LDL-コレステロールの取り込みが進み、肝臓でのコレステロール合成が抑制された可能性も示唆される。また、腸内細菌が生成した SCFA は、代謝的に肝臓でのコレステロール合成を抑制する<sup>40, 41)</sup>。とくにプロピオン酸は、結腸粘膜から速やかに吸収され、門脈を介して肝臓に到達し、酢酸からの新規な脂質合成を抑制すると報告されている<sup>42)</sup>。本研究では **WM** 群においてプロピオン酸をはじめ、総 SCFA の増加がみられており、これにより脂質合成を抑制した可能性が示唆される。また水溶性食物繊維はコレステロールの吸収を抑制することにより、糞便への排泄を増加させる<sup>40)</sup>。今回、糞便中コレステロールは **CN** 群 ( $0.96 \pm 0.16$  mg/feces/day) に対し **BM** 群において有意な増加が認められた ( $1.32 \pm 0.22$  mg/feces/day)<sup>36)</sup>。腸内細菌による発酵を受けにくい不溶性食物繊維は、水分を吸収し糞便の嵩を増すことや、糞中への胆汁酸排泄を促進し、コレステロールを糞中へ排出することが明らかになっている<sup>43, 44)</sup>。今回不溶性食物繊維含量の高い **BM** 群での糞便重量も有意に増加したことがコレステロール排泄が増加した一因と考えられる。

また、ラットの盲腸内において酢酸、プロピオン酸、酪酸および総 SCFA 生成量が、**WM** 群のみで有意に増加した<sup>36)</sup>。これは、ホワイトマッシュルームにはブラウンマッシュルームよりも水溶性食物繊維が多く含まれていることや (Table 1)、**WM** 添加食には **BM** 添加食に比べて糖質が多く含まれていることが関係していると考えられる (**WM** ; 2.49%, **BM** ; 0.95% ; マッシュルーム中の糖質含量から食餌中のマッシュルーム由来の糖質含量を算出した)。マッシュルームに含まれている糖質のほとんどがマンニトールやトレハロースである<sup>45)</sup>。通

常、糖質のほとんどは大腸に到達する前に消化管で消化、吸収されるが、これらの糖は難消化性の性質を示すため、大腸まで到達して腸内細菌により利用され、SCFA の生成に関与すると考えられている<sup>46)</sup>。以前の研究で、マンニトールの74%はヒトの小腸を通過して、大腸まで達し、有用菌に利用され、SCFA が生成されると報告されている<sup>47)</sup>。

また、マッシュルームに含まれる難消化性タンパク質もまた腸内発酵に重要な影響を与える。Morita ら (1997 年) は、米タンパク質、大豆タンパク質およびペプチドのような難消化性タンパク質は腸内細菌の相対比を変化させ、n-酪酸の産生を促進すると報告している<sup>48)</sup>。本研究では、とくに糖質含量の高いホワイトマッシュルームにおいて難消化性糖質と難消化性タンパク質の相乗効果によって腸内発酵に影響を与えた可能性がある<sup>36)</sup>。しかしこれらを明らかにするにはさらなる検討が必要である。

また以前の研究で、オーツ麦由来の $\beta$ -グルカンが *E. coli* や *B. subtilis* の細胞膜浸透性を変化させることにより増殖を抑制すると報告されている<sup>49)</sup>。また、*Poria cocos* や *Polyporus rhinoceros* のようなキノコ由来の $\beta$ -グルカンが *in vitro* 発酵試験において 24 時間で *Lactobacillus brevis* と *Bifidobacterium longum* の増殖を促進したと報告している<sup>50)</sup>。 $\beta$ -グルカンの腸内発酵への効果の正確な作用機序は明らかではないが、過去の報告<sup>49,50)</sup> と照らし合わせると、今回の結果はマッシュルーム粉末中の $\beta$ -グルカンが大腸菌の細胞膜を破壊することで増殖を抑制し、*Lactobacillus* や *Lactic acid bacteria* といった有用菌の増殖を促進したと考えられる。

本研究では2種のマッシュルーム(ホワイト, ブラウン)の腸内発酵および脂質代謝への影響を *in vitro* および *in vivo* 試験により調査したところ、2種のマッシュルーム、とくにホワイトマッシュルームは有害菌の増殖抑制や短鎖脂肪酸

生成量の増加が顕著であり，それらの腸内環境改善効果を通じて脂質代謝に対しても有用な効果を持つことが示唆された。

## 第3章

乾燥ポテト粉末製造工程における各段階のポテト粉末の  
*in vitro* および *in vivo* 試験における腸内発酵および  
脂質代謝改善効果

## 1. 緒言

難消化性デンプン（レジスタントスターチ；RS）とは，健常人の小腸管腔内において消化吸収されることのないデンプンおよびデンプンの部分分解物の総称と定義されている<sup>1)</sup>。RSは，デンプンでありながら水溶性・不溶性の両方の食物繊維の性質をもち，摂取したRSは胃や小腸で消化されずに大腸まで到達し，腸内細菌の栄養源として発酵され，酢酸，プロピオン酸，酪酸，などの短鎖脂肪酸（Short-chain fatty acid；SCFA）へ代謝される<sup>2)</sup>。それにより，pHが低下することでミネラルの吸収促進，乳酸菌などの有用菌の増加，ウェルシュ菌などの有害菌の増殖抑制をもたらすことで腸内環境改善効果をもたらす<sup>3)</sup>。また発酵により生成したSCFAは，代謝的に肝臓でのコレステロール合成を抑制し，中でもプロピオン酸が結腸粘膜から吸収され，肝臓での脂質合成を抑制するなど，プレバイオティクス効果による脂質代謝への影響については多々報告がされている<sup>4,5)</sup>。

RSは，物理的・化学的性質からRS1～4に分類されている<sup>1,6)</sup>。また，摂取したRSの種類によって異なる発酵パターンを示し，生理効果に違いが生じると報告されている<sup>7,8)</sup>。Cummingsら（1996年）は，ヒトがRS2を摂取した場合，糞便中のSCFAのうち酢酸生成量が多く，RS3は大腸においてプロピオン酸を多く産生すると報告している<sup>9)</sup>。またQianら（2013年）は，RS3の摂取はRS2やRS4と比較し，マウス盲腸におけるpH低下，アンモニア産生，SCFA産生の増加を顕著に示すと報告している<sup>10)</sup>。

馬鈴薯デンプン粒子およびこれらの粒子中のアミロペクチン分子に直接リンがエステル結合した高リン構造は，アミラーゼによる加水分解に対し影響を及

ぼしている<sup>11)</sup>。粒子の大きい馬鈴薯の生デンプンは、とくに消化され難い<sup>12)</sup>。馬鈴薯デンプンのような高リンデンプンをアミラーゼなどのデンプン分解酵素で分解した際、リン酸基付近には酵素が作用できないため、分解終了時にオリゴ糖が生じる<sup>13,14)</sup>。また、多数の馬鈴薯デンプンを糊化後に酵素消化すると、消化率とリン含量との間に負の相関性が認められ、高リンデンプンはRS含量が高いことが明らかになっている<sup>15)</sup>。馬鈴薯の高リンデンプンは主にRS2に特徴づけられる<sup>16)</sup>。

馬鈴薯のRS含量は、調理方法とその温度によって変化する<sup>17)</sup>。生の馬鈴薯デンプン(RS2)は加熱調理後、糊化され消化酵素によって分解されやすい状態に変化するが、その後冷却すると老化デンプン(RS3)となり、再び消化性が低下する<sup>17,18)</sup>。近年ではドラムドライ加工によって生成されたRS3を含む馬鈴薯フレークがその消化抵抗性によって盲腸内の短鎖脂肪酸を増加させたという報告がされている<sup>19)</sup>。したがって、乾燥馬鈴薯粉末加工工程中で異なった生理的効果がみられる可能性があるが、加工における腸内発酵性や脂質代謝への影響についての報告は少ない。本研究では、馬鈴薯の加工品の一つである乾燥馬鈴薯粉末製造工程(生馬鈴薯、ブランチ、スチーム、ドラムドライ加工馬鈴薯)における腸内環境および脂質代謝に与える影響の変化について、*in vitro* および *in vivo* 試験により検討した。

## 2. 実験方法

### 1. 実験試料

4種類の乾燥馬鈴薯粉末は株式会社カルビーポテト（帯広，日本）から提供され，原料には北海道十勝地域で栽培された馬鈴薯を使用している。

製造工程およびそれぞれの馬鈴薯粉末試料は以下のとおりである。皮をむいた馬鈴薯を厚さ約 1 cm に切断し（生の馬鈴薯；RP），70°C の湯で 20 分間低温加熱した（ブランチ馬鈴薯；BP）。次に 4°C の冷水で 20 分間冷却した後，クッカーで 120°C，30 分加熱した（スチーム馬鈴薯；SP）。さらに裏ごし器にかけた後，ドラムドライヤーを用いて高温蒸気加熱乾燥した（ドラムドライ馬鈴薯；DP）。DP 以外の試料はそれぞれ凍結乾燥し，すべての乾燥試料をフードプロセッサーで粉末化した（Fig.1）。各乾燥馬鈴薯粉末の RS 含量は RS 測定キット（Megazyme, Wicklow, IRL）を用いて測定した。タンパク質含量はケルダール法により測定した<sup>20)</sup>。

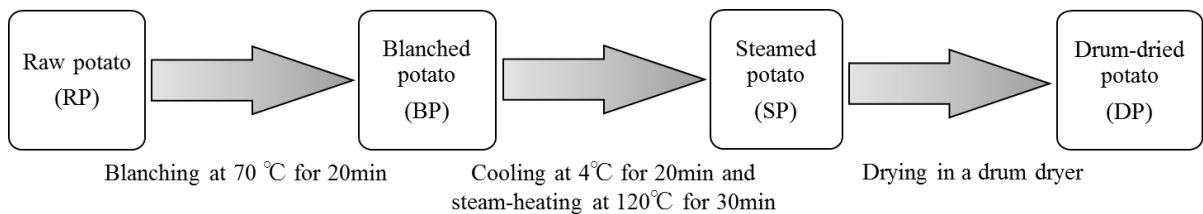


Fig. 1. Manufacturing process of dry potato powders.

## 2. *in vitro* 試験

### 1) 腸内細菌叢の培養条件

ジャーファーマンター（微生物培養装置 BMJ-01NC；エイブル株式会社，東京，日本）を用いて培養試験を行った。窒素源が全培養液の 0.8%となるように非選択培地（ニュートリエントブロス；Difco Laboratories, MI, USA）を培養槽に加えて 121°C で 15 分間滅菌した。ジャーファーマンターに添加する腸内細菌は，豚の新鮮な糞便（長内畜産株式会社，帯広，日本）を用いた。糞便を滅菌生理食塩水で 10 倍に希釈して，固形物を取り除いたろ液を細菌液とし，全培養液の 2%となるように培養槽に加えた。試料は，対照としてセルロース（SIGMA-ALDRICH, MO, USA）を用いた。4 種類の乾燥馬鈴薯粉末をそれぞれ炭素源が全培養液の 3%となるように加え，48 時間嫌気培養を行った。培養液のサンプリングは培養開始から 0，12，24，48 時間において行い，滅菌した 2 ml 容マイクロチューブに採取した。また，サンプリング時に培養液の pH を記録した。細菌叢分析用の培養液は 4°C で保存し，短鎖脂肪酸および腸内腐敗物質の分析用サンプルは 10,000 rpm，4°C，10 分間遠心分離し，上清を使用時まで-30°C で保存した。

### 2) 腸内細菌叢分析

それぞれの時間においてサンプリングした培養液に，滅菌生理食塩水を加えることによって 10 倍希釈系列を作成し，細菌叢を解析した。Coliform の測定は，EMB 寒天培地（栄研化学株式会社，東京，日本）で 37°C，24 時間，Anaerobe の測定は BL 寒天培地（栄研化学株式会社）にウマ脱繊維血液を添加した培地で 37°C，48 時間嫌気培養した。Lactobacillus の測定は，Rogosa 寒天培地（関東化学株式会社，東京，日本）に氷酢酸を添加した培地で 37°C 48 時間嫌気培養，



*Bifidobacterium* の測定は、TOS プロピオン酸寒天培地（ヤクルト薬品工業株式会社、東京、日本）で 37°C、72 時間嫌気培養し、それぞれ平板塗抹法を用いた。また、*Cl. perfringens* の測定は、OPSP 寒天培地（関東化学株式会社）に抗生物質として、サプリメント A（スルファジアジンナトリウム含有）とサプリメント B（オランダマイシン、ポリミキシン B 含有）を添加した培地で、Lactic acid bacteria の測定には、M.R.S.寒天培地（関東化学株式会社）で 37°C、48 時間混釈培養法を用いた。また嫌気培養にはアネロパック・ケンキシシステム（三菱ガス化学、東京、日本）を用いた。培養後、各培地で形成されたすべてのコロニー数（Colony Forming Units ; CFU）を計測し、測定値の対数を求めた<sup>21-23</sup>。

### 3) 短鎖脂肪酸分析

盲腸内容物の混濁液を 10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し、得られた上清 0.5 ml に 0.4 N 過塩素酸を 25 µl 加え、攪拌後に 10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。得られた上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用ディスクパーザブルフィルター（東ソー株式会社、東京、日本）に通し、調整試料を得た。この試料の 25 µl を HPLC（LC-10AD ; 島津製作所、京都、日本）に供し BTB ポストカラム法<sup>24</sup>により短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）を定量した。

### 4) アンモニア分析

培養液中のアンモニア窒素濃度はアンモニア測定キット（アンモニア-テストワコー ; 和光純薬工業株式会社、大阪、日本）を用いて、比色法により測定した<sup>25</sup>。

### 5) インドールおよびスカトール分析

インドールおよびスカトールの分析には、いずれも発色試薬として p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いた比色法により定量した。インドールは 568nm, スカトールは 630nm の吸光度を分光光度計で測定した<sup>26)</sup>。

## 3. *in vivo* 試験

### 1) 実験動物および食餌飼料

実験動物は、7 週齢の Fischer 系雄性ラット（日本チャールズ・リバー株式会社、横浜、日本）25 匹を用いた。飼育条件は 12 時間の明暗周期、温度  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60\pm 5\%$  で管理した。ラットは 1 匹ずつプラスチックケースに分けて個別に飼育した。1 週間の予備飼育による順化期間の後に 5 つの投与群に分け、各群 5 匹として実験食の投与期間を 4 週間設けた。実験食は AIN93G（日本クレア株式会社、東京、日本）を基準食として用い、これに乾燥馬鈴薯粉末を 30% 添加し、成分調製をして、生馬鈴薯粉末添加食群（RP 群）、ブランチ馬鈴薯粉末添加食群（BP 群）、スチーム馬鈴薯粉末添加食群（SP 群）、ドラムドライ馬鈴薯粉末添加食群（DP 群）とした。食餌組成を Table 1 に示す。水と食餌は自由摂取とし、摂食量は毎日、体重は毎週測定した。毎週採血の 12 時間前に絶食し 1 ml の採血を行い、血液は 1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、2 時間室温で静置したのち 7,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を分析まで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。投与実験の終了後、ラットはネンブタール（sodium pentobarbital ; Abbott Laboratories, IL, USA）により麻酔（40 mg/kg 体重）をした後、腹腔を切開し肝臓、盲腸を摘出した。このうち肝臓は冷生理食塩水（9 g NaCl/l）で洗浄、重量を測定し、分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。盲腸は内容物と盲腸壁に分け、それぞれの重量を測定し、内容物約 1 g 量り、滅菌生理食塩水で 10 ml とし、その懸濁液の一部を短鎖脂肪酸測定用

に-30°C で，細菌叢測定用に 4°C で保存した。実験動物の取り扱いについては Guide of Care and Use of Laboratory (1985 年) に従った<sup>27)</sup>。

Table 1. Compositions of experimental diets (%).

	CN	RP	BP	SP	DP
Casein	20	20	20	20	20
L-cystine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Soybean oil	5	5	5	5	5
Mineral 93G	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin 93G	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
t-butylhydroquinone	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Sucrose	10	10	10	10	10
Cellulose	5	5	5	5	5
$\alpha$ -corn starch	54.949	24.949	24.949	24.949	24.949
RP powder	—	30	—	—	—
BP powder	—	—	30	—	—
SP powder	—	—	—	30	—
DP powder	—	—	—	—	30
Nitrogen (g/100g)	3.25	3.83	4.04	3.96	3.95
Resistant starch (g/100g)	0.73	9.69	1.65	2.13	0.81
Energy (kcal/g)	3.86	3.67	3.83	3.82	3.84

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder.

## 2) 腸内細菌叢分析

盲腸内容物懸濁液に，滅菌生理食塩水を加えることによって 10 倍希釈系列を作成し，細菌叢を解析した。Coliform の測定は，EMB 寒天培地（栄研化学株式会社，東京，日本）で 37°C，24 時間，Anaerobe の測定は，BL 寒天培地（栄研化学株式会社）にウマ脱繊維血液を添加した培地で 37°C，48 時間嫌気培養した。

*Lactobacillus* の測定は Rogosa 寒天培地（関東化学株式会社，東京，日本）に氷酢酸を添加した培地で 37°C，48 時間嫌気培養，*Bifidobacterium* の測定は，TOS プロピオン酸寒天培地（ヤクルト薬品工業株式会社，東京，日本）で 37°C，72 時間嫌気培養し，それぞれ平板塗抹法を用いた。また，*Cl. perfringens* の測定は，OPSP 寒天培地（関東化学株式会社）に抗生物質として，サプリメント A（スルファジアジンナトリウム含有）とサプリメント B（オランダマイシン，ポリミキシン B 含有）を添加した培地で，Lactic acid bacteria の測定は，M.R.S.寒天培地（関東化学株式会社）で 37°C，48 時間混釈培養を行った。また嫌気培養にはアネロパック・ケンキシシステム（三菱ガス化学，東京，日本）を用いた。培養後，各培地で形成されたすべてのコロニー数 (Colony Forming Units ; CFU) を計測し，測定値の対数を求めた<sup>21-23)</sup>。

### 3) 盲腸内 pH および短鎖脂肪酸分析

盲腸の内容物約 1 g を滅菌生理食塩水で溶かして 10 ml とし，pH メーター (SevenCompact, メトラー・トレド株式会社，東京，日本) により pH を測定した後，短鎖脂肪酸分析を行った。盲腸内容物の混濁液を 10,000 rpm，4°C で 10 分間遠心分離し，得られた上清 0.5 ml に 0.4 N 過塩素酸を 25 µl 加え，攪拌後に 10,000 rpm，4°C で 10 分間遠心分離を行った。最後に得られた上清を HPLC 用ディスポーザブルフィルター（東ソー株式会社，東京，日本）に通し，調製試料を得た。この試料の 25 µl を HPLC (LC-10AD, 島津製作所，京都，日本) に供し，BTB ポストカラム法<sup>24)</sup> により短鎖脂肪酸濃度を定量した。

### 4) 血清コレステロール分析

総コレステロール，HDL コレステロールの測定は酵素法 (TDX システム；

Abbott Laboratories, IL, USA) により行った。総コレステロールと HDL-コレステロール濃度の差を VLDL+IDL+LDL-コレステロール濃度とした。

#### 5) 肝臓コレステロールおよび糞便中ステロール分析

肝臓および糞中の全脂質は、クロロホルム-メタノール混合溶媒 (2 : 1, v/v) で抽出した。その後 Matsubara ら (1990 年) の方法<sup>28)</sup> によって、中性ステロールアセテート誘導体を得てガスクロマトグラフィー (GLC) (GC-14A ; 島津製作所) に供した。中性ステロールの定量は DB17 キャピラリーカラム (0.25 mm×30 mm ; J&W scientific, CA, USA) を用いて窒素を移動相とし、水素炎イオン化検出機で分析を行った。温度条件はカラム 260°C, 試料注入部および検出部を 300°C とした。

糞中の胆汁酸の定量は Grundy ら (1965 年) の方法<sup>29)</sup> に従って行った。リトコール酸, デオキシコール酸, ケノデオキシコール酸およびコール酸を標準物質とし, GLC の条件は上記と同様にし, カラム温度のみ 270°C とした。

#### 4. 統計分析

それぞれのデータは平均値±標準偏差で表した。データ間の有意差検定は Tukey-Kramer test の多重比較検定法にて行い,  $p < 0.05$  を有意差とした。

### 3. 結果

#### 1. *in vitro* 試験

##### 1) 培養液 pH

培養開始 12 時間以降セルロース添加区に比べ、すべての乾燥馬鈴薯粉末添加群において有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。 (Fig.2)。

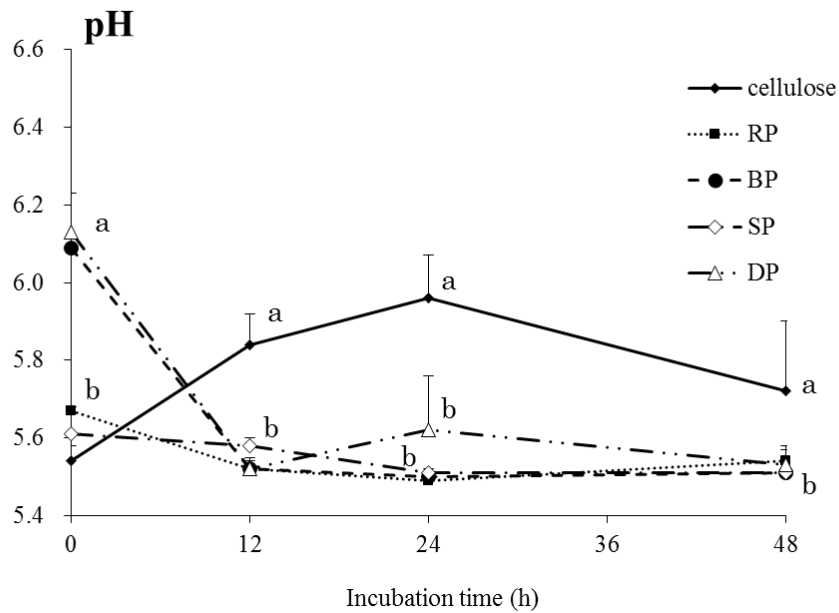


Fig. 2. The pH changes in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder.

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean $\pm$ standard deviation (n=5).

Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 2) 培養液中細菌叢

*Cl. perfringens* に有意差は認められなかった (Fig.3)。Coliform は、培養開始 24 時間で cellulose 群に対し RP 群で有意に低下し ( $p < 0.05$ ), SP 群においても減少がみられた。培養開始 48 時間では cellulose 群に対し RP, DP, SP 群において有意な減少を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig.4)。Anaerobe は、培養開始 12 時間で cellulose 群に対しすべての乾燥馬鈴薯粉末添加群で有意に高値を示し ( $p < 0.05$ ), 24 時間では RP, BP, SP 群で有意な増加を示した ( $p < 0.05$ )。48 時間では cellulose 群に対し RP, BP, DP 群で有意な増加を示した ( $p < 0.05$ )

(Fig.5)。Lactic acid bacteria は培養開始 12 および 24 時間で cellulose 群に対し BP, DP 群で有意な増加がみられた ( $p < 0.05$ )。培養開始 48 時間では有意差は認められなかった (Fig.6)。Lactobacillus および Bifidobacterium は、培養開始 12 時間以降すべての乾燥馬鈴薯粉末添加群で cellulose 群に対し有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig.7, 8)。

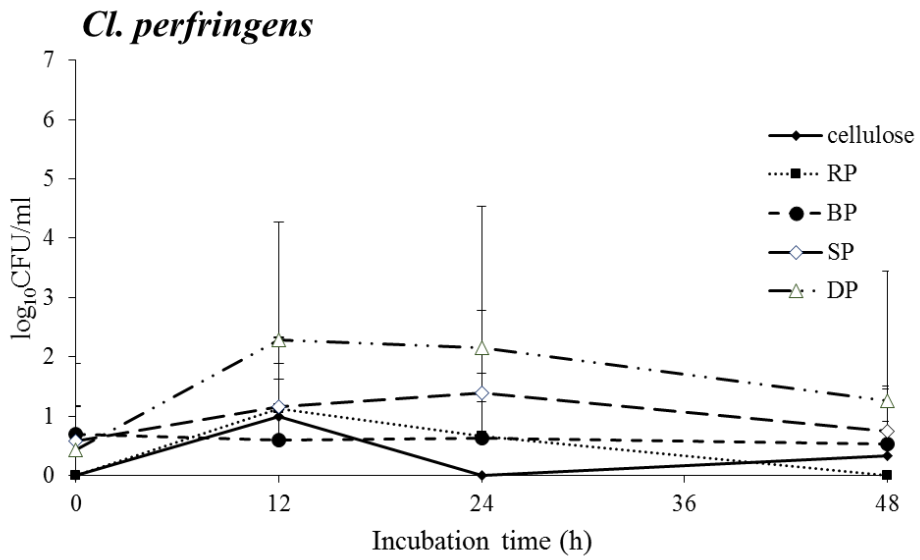


Fig. 3. *Cl. perfringens* levels changes in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder.

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5).



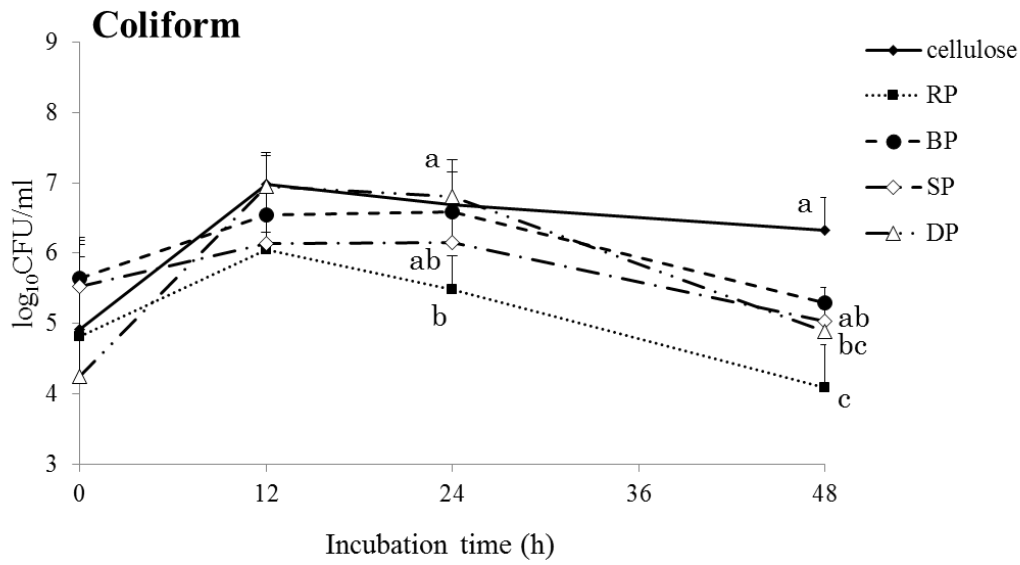


Fig. 4. Coliform levels changes in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder.

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b, and c;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

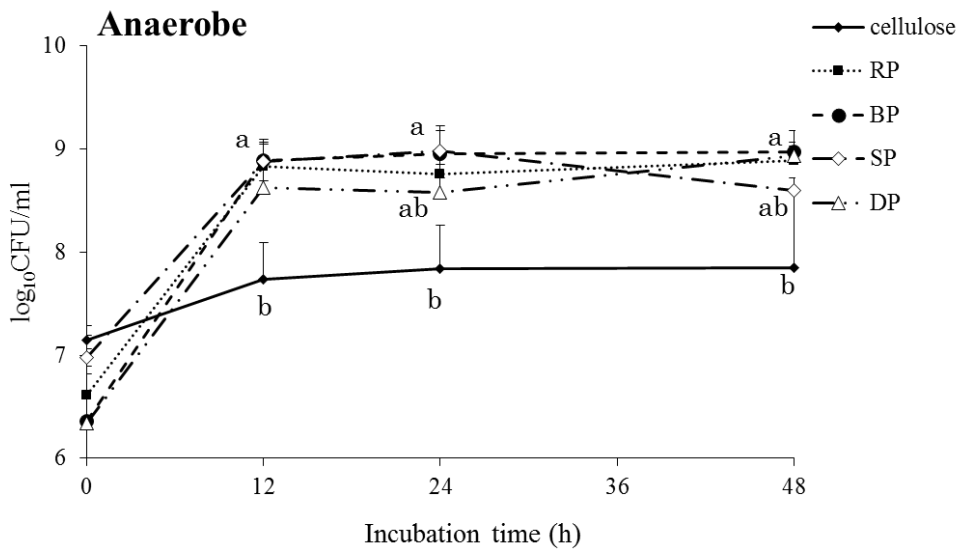


Fig. 5. Anaerobe levels changes in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder.

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5).

Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

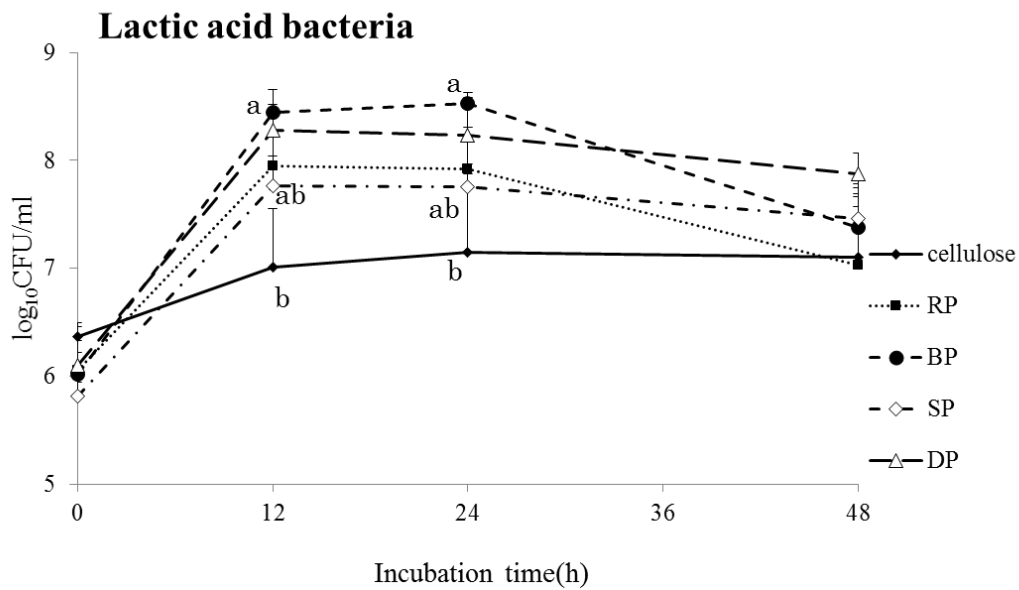


Fig. 6. Lactic acid bacteria levels changes in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder.

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5).

Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

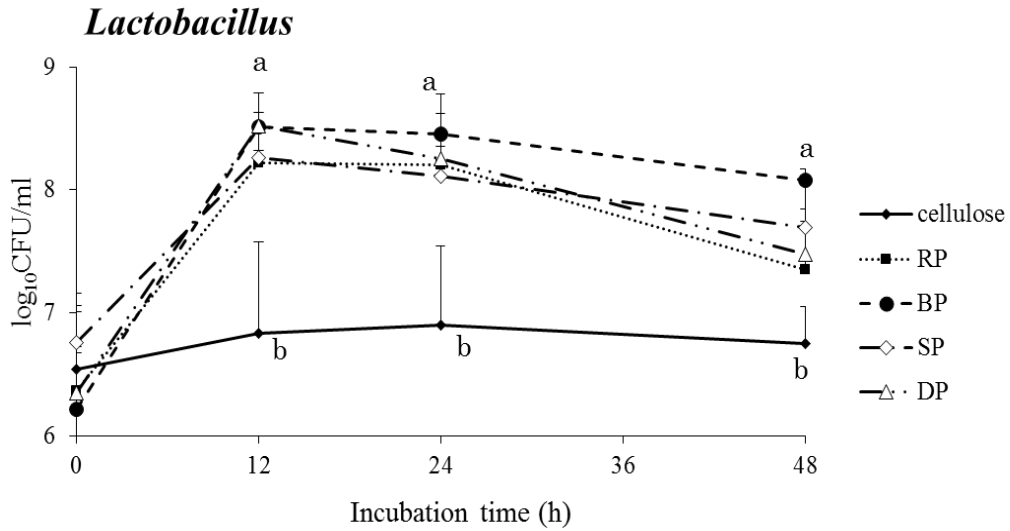


Fig. 7. *Lactobacillus* levels changes in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder.

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5).

Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

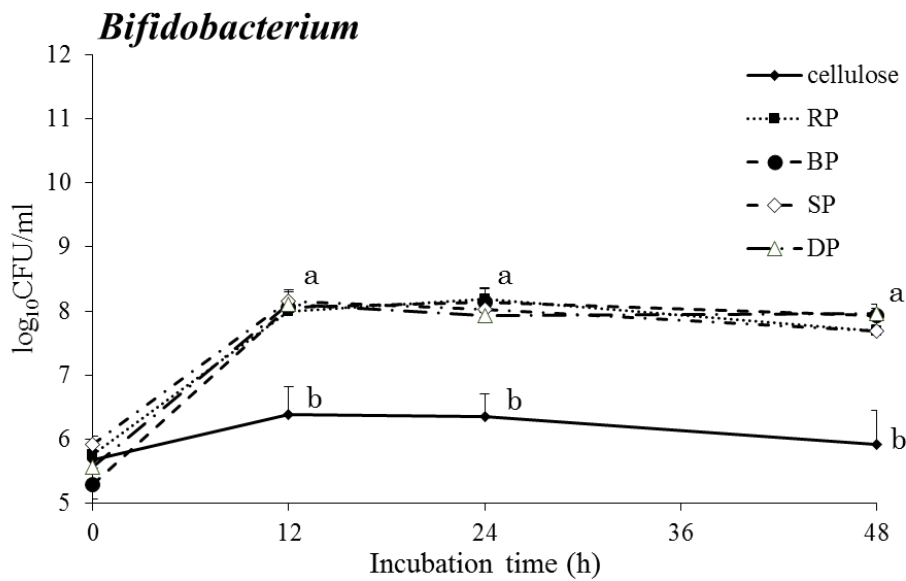


Fig. 8. *Bifidobacterium* levels changes in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

### 3) 培養液中短鎖脂肪酸濃度

酢酸生成量は、培養開始 12 時間以降 cellulose 群に対して、すべての乾燥馬鈴薯粉末添加群で有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig.9)。プロピオン酸生成量においても同様に、培養開始 12 時間以降、cellulose 群に対して、すべての乾燥馬鈴薯粉末添加群で有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig.10)。酪酸生成量は、培養開始 24 時間で cellulose 群に対し BP, SP, DP 群で有意に高値を示し ( $p < 0.05$ )、48 時間では SP, DP 群で有意に高値を示した (Fig.11)。総短鎖脂肪酸生成量においては培養開始 12 時間以降すべての乾燥馬鈴薯粉末添加群で cellulose 群に対し有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig.12)。

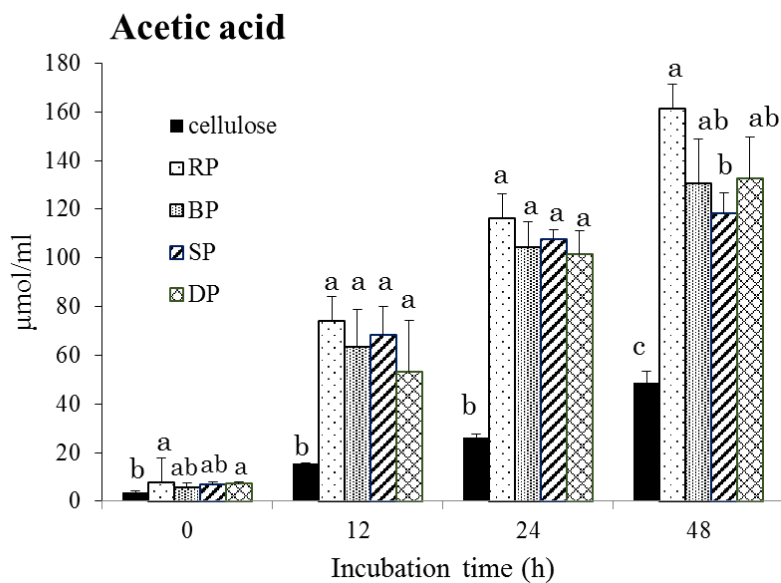


Fig. 9. Acetic acid concentrations in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b, and c;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

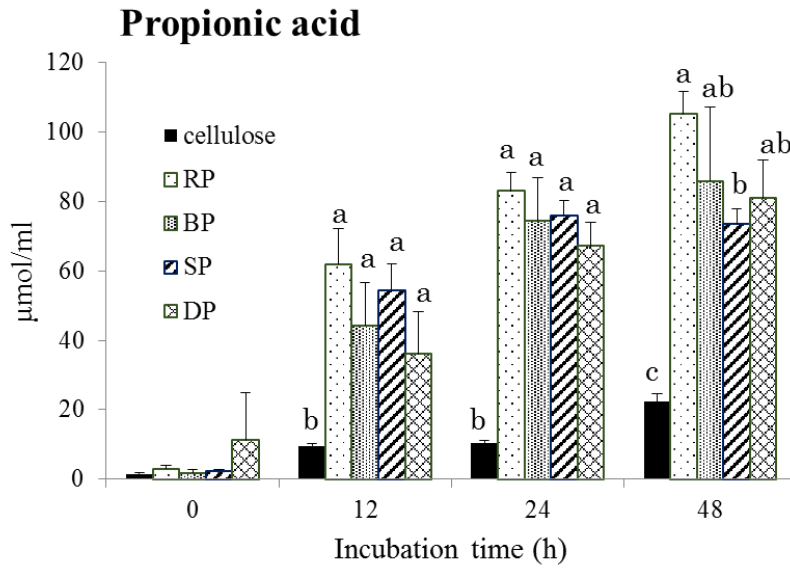


Fig. 10. Propionic acid concentrations in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b, and c;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.



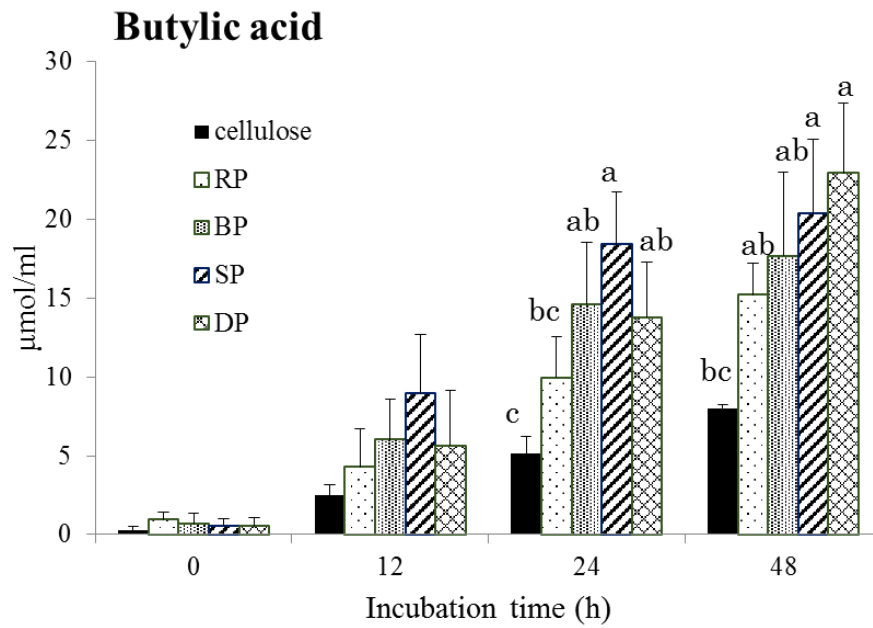


Fig. 11. Butyric acid concentrations in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b, and c;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

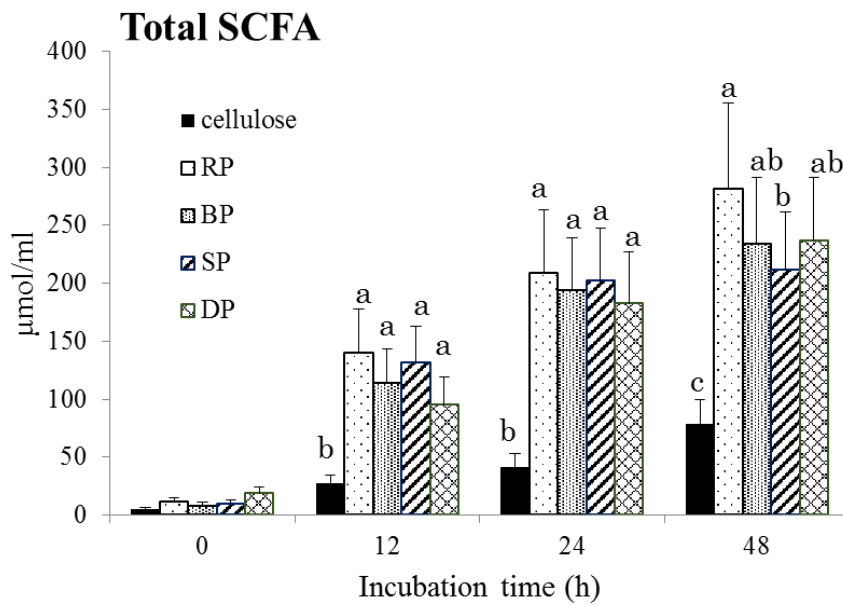


Fig. 12. Total SCFA concentrations in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b, and c;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

#### 4) 培養液中アンモニア濃度

アンモニア濃度は、培養開始 12 時間で cellulose 群に対し RP 群で有意に低値を示し、24 時間では RP, BP, SP 群で、48 時間ではすべての乾燥馬鈴薯粉末添加群で cellulose 群に対し有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig.13)。

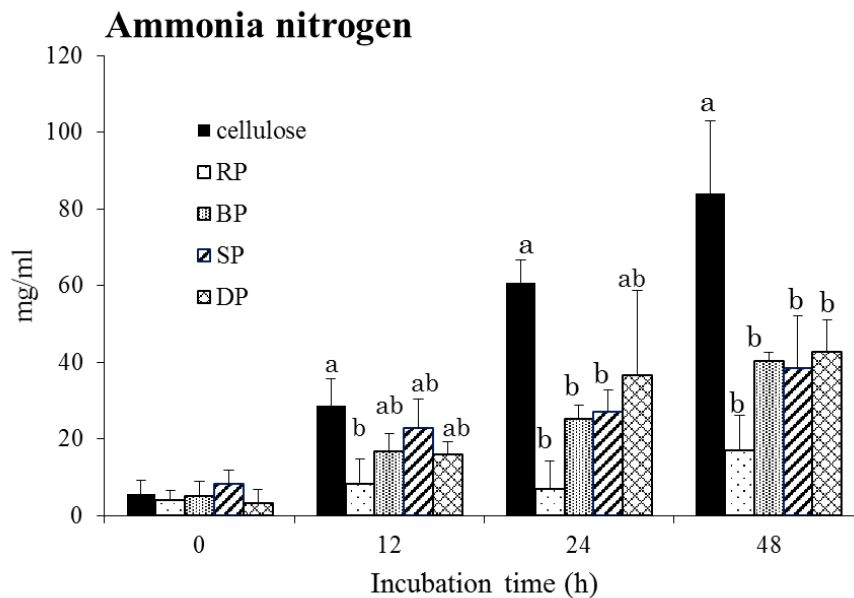


Fig. 13. Ammonia nitrogen concentrations in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean $\pm$ standard deviation (n=5).

Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

### 5) 培養液中インドールおよびスカトール濃度

インドール濃度は、どの培養時間においても有意差は認められなかった (Fig.14)。スカトール濃度は培養開始 12 時間で cellulose 群に対し RP 群で有意に低値を示し ( $p < 0.05$ )、24 時間で有意差はなくなったが、48 時間で BP, SP, DP 群で cellulose 群に対し有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig.15)。

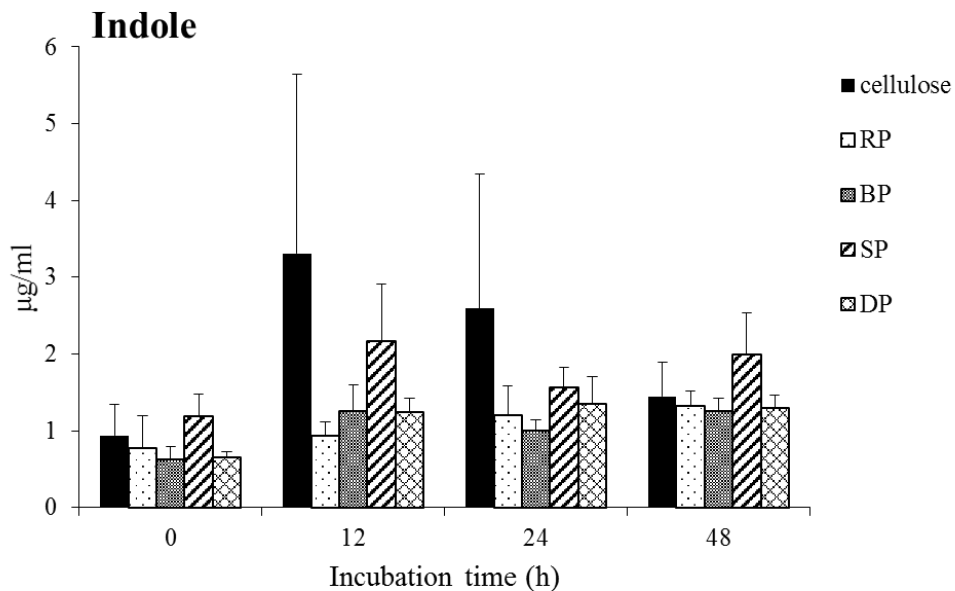


Fig. 14. Indole concentrations in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5).

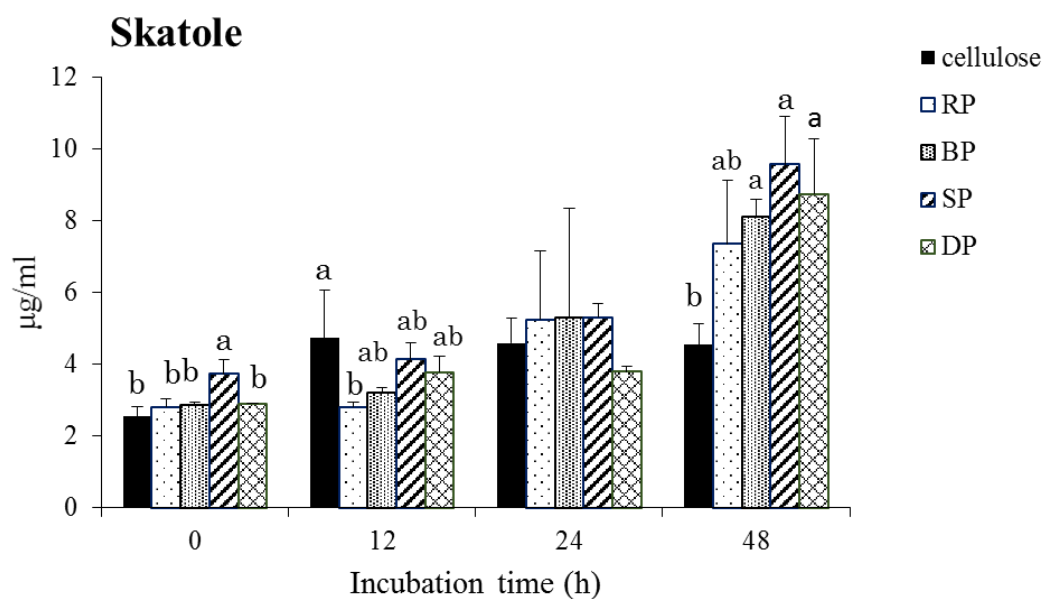


Fig. 15. Skatole concentrations in *in vitro* fermentation at 0, 12, 24, 48 h of cellulose, RP, BP, SP, DP powder

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent mean±standard deviation (n=5). Significant differences between means (a,b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 2. *in vivo* 実験

### 1) RS およびタンパク質含量

Table 2 に各乾燥馬鈴薯粉末の RS 含量とタンパク質含量を示す。RS 含量は RP 群がいちばん高値を示し、次いで SP 群、BP 群、DP 群の順であった。タンパク質含量は BP 群がいちばん高値を示し、次いで SP 群、DP 群、RP 群の順であった。

Table 2. Resistant starch and protein content in each potato powder.

	Resistant starch (%)	Protein (%)
RP	31.2	12.2
BP	4.4	16.7
SP	6.0	14.9
DP	1.6	14.8

RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder.

## 2) 体重, 摂取量および各種臓器重量

体重や摂食量, 摂食効率および肝臓重量に有意差は認められなかった。投与4週間後の体重増加量はCN群と比較してDP群で有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。精巢周囲脂肪, 腎臓周囲脂肪重量はCN群と比較して有意差は認められなかった (Table 3, 4)。

Table 3. Body weight, food intake, liver weight, cecal weight, and fecal weight in rats fed a diet supplemented with potato powders.

	CN	RP	BP	SP	DP
Initial body weight (g)	176±7	177±8	177±7	177±7	178±8
Final body weight (g)	240±8	237±6	242±10	237±7	247±9
Body weight gain (g/4wk)	63.4±5.4 <sup>ab</sup>	60.6±3.9 <sup>b</sup>	65.6±4.4 <sup>ab</sup>	60.7±4.7 <sup>b</sup>	69.5±2.4 <sup>a</sup>
Total food intake (g/4wk)	471±48	470±41	438±30	423±28	488±43
Feed efficiency	0.135±0.016	0.130±0.015	0.150±0.010	0.144±0.015	0.143±0.009

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent means standard deviation (n=5). Significant differences among means (a, b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

Table 4. Organ and organ fat weight in rats fed a diet supplemented with potato powders.

	CN	RP	BP	SP	DP
Liver weight (g)	8.49±0.31	8.38±0.53	8.89±0.47	8.35±0.30	8.24±0.55
Cecum weight (g)	3.80±0.53 <sup>c</sup>	8.40±1.82 <sup>a</sup>	5.49±0.57 <sup>bc</sup>	5.73±0.72 <sup>b</sup>	4.15±0.36 <sup>bc</sup>
Epididymal fat (g)	5.08±0.60	4.32±0.65	4.36±0.44	4.46±0.59	5.19±0.64
Kidney envelope fat (g)	5.79±0.90	4.76±0.75	4.89±0.47	4.69±0.54	5.75±0.66

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent means standard deviation (n=5).

Significant differences among means (a, b and c;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.



### 3) 盲腸内 pH, および盲腸内細菌叢

盲腸内容物の pH は, CN 群と比較してすべての乾燥馬鈴薯粉末投与群で有意に減少し, とくに RP 群で低値を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig.16)。盲腸内容物量は RP 群で CN 群と比較して有意に増加した ( $p < 0.05$ )。Coliform は CN 群と比較して RP, SP 群で有意に増加した ( $p < 0.05$ )。Anaerobe および Lactic acid bacteria は, CN 群と比較して RP 群で有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Table 5)。

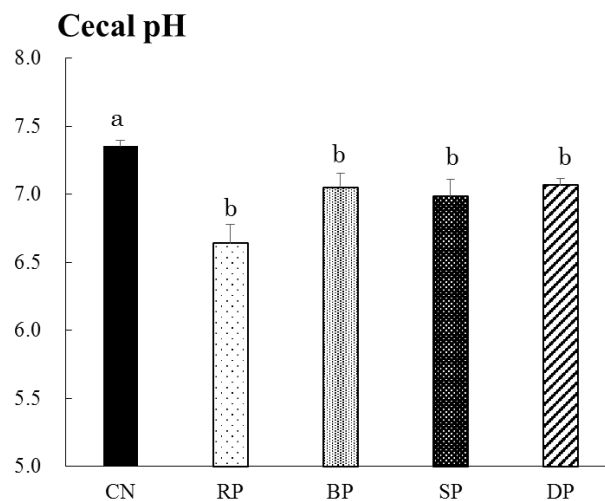


Fig. 16. Cecal pH in rats fed a diet supplemented with potato powders.

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent means standard deviation (n=5). Significant differences among means (a, b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

Table 5. Cecum contents weight and cecal bacteria levels in rats fed a diet supplemented with potato powders.

	CN	RP	BP	SP	DP
Cecum contents weight (g)	3.00±0.31 <sup>b</sup>	6.44±1.63 <sup>a</sup>	3.93±0.60 <sup>b</sup>	4.19±0.40 <sup>b</sup>	2.90±0.40 <sup>b</sup>
Coliform (log <sub>10</sub> CFU/contents)	7.03±0.26 <sup>b</sup>	8.22±1.05 <sup>a</sup>	7.61±0.44 <sup>ab</sup>	8.25±0.70 <sup>a</sup>	7.20±0.28 <sup>ab</sup>
Anaerobe (log <sub>10</sub> CFU/contents)	8.98±0.68 <sup>b</sup>	10.37±0.66 <sup>a</sup>	9.35±0.49 <sup>b</sup>	9.41±0.30 <sup>b</sup>	9.22±0.17 <sup>b</sup>
Lactic acid bacteria (log <sub>10</sub> CFU/contents)	8.34±0.22 <sup>b</sup>	9.28±0.70 <sup>a</sup>	8.39±0.23 <sup>b</sup>	8.66±0.64 <sup>ab</sup>	7.88±0.15 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus</i> (log <sub>10</sub> CFU/contents)	7.34±0.78 <sup>ab</sup>	8.28±0.88 <sup>a</sup>	7.39±0.60 <sup>ab</sup>	7.43±0.50 <sup>ab</sup>	6.71±0.77 <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium</i> (log <sub>10</sub> CFU/contents)	7.97±1.57 <sup>ab</sup>	8.87±0.74 <sup>a</sup>	7.89±0.46 <sup>ab</sup>	8.20±0.65 <sup>ab</sup>	7.19±0.30 <sup>b</sup>

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent means standard deviation (n=5). Significant differences among means (a, b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

#### 4) 盲腸内短鎖脂肪酸濃度

酢酸，プロピオン酸，酪酸，総短鎖脂肪酸生成量は，CN 群と比較して RP 群で有意に増加し，SP 群でもプロピオン酸，酪酸，総短鎖脂肪酸生成量において CN 群と比較して有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Fig.17)。

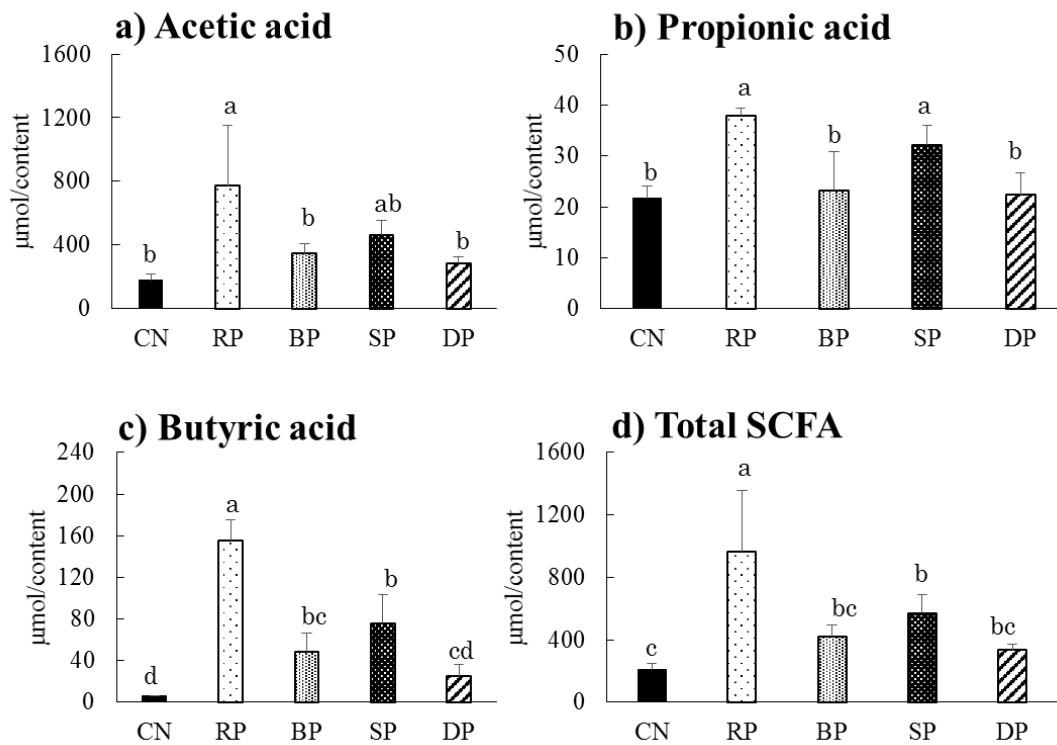


Fig. 17. Cecal SCFA content in rats fed a diet supplemented with potato powders.

a, Acetic acid; b, Propionic acid; c, Butyric acid; d, Total SCFA. Values represent means  $\pm$  standard deviation ( $n=5$ ). Significant differences among (a, b, c and d;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 5) 血中脂質

血中中性脂肪および遊離脂肪酸濃度は、CN 群と比較して RP 群で有意に低下した ( $p < 0.05$ )。総コレステロール、HDL-コレステロール濃度はすべての群間で有意差は認められなかった (Table 6)。

Table 6. Serum glucose and lipid in rats fed a diet supplemented with potato powders.

	CN	RP	BP	SP	DP
Glucose (mmol/L)	4.37±0.34	5.26±0.40	5.27±0.25	4.76±0.55	5.45±0.49
Free fatty acid (mmol/l)	1267±100 <sup>a</sup>	926±86 <sup>b</sup>	864±74 <sup>b</sup>	917±227 <sup>b</sup>	980±179 <sup>b</sup>
Phospho lipid (mmol/l)	1.34±0.12	1.28±0.06	1.34±0.06	1.34±0.06	1.35±0.11
Total cholesterol (mmol/l)	1.78±0.18	1.80±0.09	1.86±0.04	1.80±0.13	1.89±0.13
HDL-cholesterol (mmol/l)	0.47±0.04	0.50±0.03	0.49±0.02	0.50±0.03	0.49±0.03
VLDL+IDL+LDL-cholesterol (mmol/l)	1.31±0.14	1.30±0.06	1.37±0.04	1.30±0.11	1.40±0.11
Triglyceride (mmol/l)	1.26±0.09 <sup>a</sup>	0.80±0.09 <sup>b</sup>	0.94±0.17 <sup>ab</sup>	0.94±0.18 <sup>ab</sup>	0.99±0.32 <sup>ab</sup>
Atherosclerosis index	2.79±0.12	2.59±0.12	2.82±0.18	0.26±0.22	2.88±0.1

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent means standard deviation (n=5). Significant differences among means (a, b;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 5) 肝臓中脂質

肝臓中の全脂質およびコレステロール濃度には、有意差は認められなかった。

(Table 7)。

Table 7. Liver total lipid and cholesterol concentrations in rats fed a diet supplemented with potato powders.

	CN	RP	BP	SP	DP
Total lipid (mg/g of wet liver)	7.21±1.41	6.31±1.03	5.90±1.62	5.83±1.71	5.70±2.62
Cholesterol (μmol/g of wet liver)	1.00±0.30	0.90±0.11	0.72±0.16	0.89±0.26	0.78±0.17

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent means standard deviation (n=5).

6) 糞中脂質

糞中の全脂質およびコプロスタノール濃度は、CN 群と比較し RP 群で有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Table 8)。

Table 8. Fecal lipid profiles in rats fed a diet supplemented with potato powders.

	CN	RP	BP	SP	DP
Total lipid (mg/g of wet feces/day)	12.7±3.24 <sup>bc</sup>	31.6±4.29 <sup>a</sup>	17.2±4.18 <sup>b</sup>	11.4±2.72 <sup>bc</sup>	8.61±2.54 <sup>b</sup>
Coprostanol (μmol/g of wet feces/day)	1.37±0.38 <sup>b</sup>	2.69±0.50 <sup>a</sup>	1.67±0.49 <sup>b</sup>	1.16±0.29 <sup>b</sup>	1.10±0.13 <sup>b</sup>
Cholesterol (μmol/g of wet feces/day)	0.60±0.16	0.92±0.34	0.80±0.33	0.53±0.17	0.54±0.23
Neutral stanol (μmol/g of wet feces/day)	1.98±0.52	3.63±0.28	2.50±0.80	1.69±0.45	1.63±0.31

CN, control; RP, raw potato powder; BP, blanched potato powder; SP, steamed potato powder; DP, drum-dried potato powder. Values represent means standard deviation (n=5). Significant differences among means (a, b and c;  $p < 0.05$ ) were determined by one-way ANOVA with Tukey test.

## 4. 考察

本研究では、馬鈴薯の加工品の一つである乾燥馬鈴薯粉末製造工程における各段階（生馬鈴薯、ブランチ、スチーム、ドラムドライ加工馬鈴薯）の乾燥粉末の腸内環境および脂質代謝に与える影響を、*in vitro* および *in vivo* 試験を用いて検討した。

馬鈴薯デンプンは、天然の形態で消化酵素による分解を受けることなく消化管を通過するため、レジスタントスターチ（RS）として知られており、物理・化学的性質から RS2 に分類される<sup>30)</sup>。生の馬鈴薯には、その構造から RS が他の作物よりも多く含まれており、多いもので 78.1%との報告もある<sup>31)</sup>。馬鈴薯デンプンは加工中に  $\alpha$  化または  $\beta$  化され、その消化性が変化する<sup>32, 33)</sup>。本研究において、乾燥馬鈴薯粉末中の RS 含量は、生の馬鈴薯で最も高く（RP ; 31.2%）、低温加熱（ブランチング）により大幅に低下し（BP ; 4.4%）、一度冷却し高温蒸気加熱（スチーム）することで若干増加し（SP ; 6.0%）、さらにドラムドライヤーで高温蒸気加熱乾燥すると減少した（DP ; 1.6%）。

馬鈴薯デンプンは、 $\alpha$ -アミラーゼの分解に強い抵抗性を示す RS2 であり、水分の多い環境内でブランチングすることで  $\alpha$  化し、消化性が高まり RS は減少する。さらにスチーム工程で冷却されることにより再結晶し、 $\alpha$ -アミラーゼによる分解を受けにくい老化デンプンとなる<sup>17)</sup>。馬鈴薯デンプンの連続的な加熱、冷却および再加熱のサイクルは、*in vitro* 試験で RS3 の量を増加させることが示されており<sup>34)</sup>、これはデンプン中のアミロースの老化によるものと報告されている<sup>35)</sup>。さらに、高温調理は RS2 を減らし、RS3 を増加させると報告されている<sup>36)</sup>。これらのことより本研究では、ブランチング加工後よりスチーム加

工後の馬鈴薯粉末で RS 含量が高いという結果を示していた。Yadav ら (2006 年) は、甘藷をスチーム加熱し、ドラムドライ加工をすることで、加熱していないものと比較してデンプン構造の空洞部分が増加し、消化酵素による消化性が高まると報告している<sup>37)</sup>。また、小麦全粒粉をドラムドライ加工することで、小麦中のタンパク質の消化性が増すと報告されている<sup>38)</sup>。今回 *in vivo* 試験において高温ドラムドライ加工した馬鈴薯粉末を投与したラットの体重増加量が上昇した<sup>39)</sup>。これは生の馬鈴薯や他の加工試料よりも、デンプンおよびタンパク質の消化性が向上し、体内に吸収されやすくなったことが示唆される。

RS は、盲腸内容物の嵩を増す不溶性食物繊維のような効果と、盲腸内で腸内細菌の発酵基質となる水溶性食物繊維の効果を両方合わせもっている。本研究で RP 投与において盲腸内容物重量がコントロールの 2 倍以上に増加した<sup>39)</sup>。RS は、ラットにおいて短鎖脂肪酸 (SCFA) 産生増加効果が報告されている<sup>40)</sup>。産生された SCFA は腸上皮から吸収され、酢酸とプロピオン酸は門脈を經由して肝臓でエネルギー代謝に利用される。酪酸は大腸上皮細胞のエネルギー源として利用される他、免疫調節物質として働く<sup>41)</sup>。とくに RS は酪酸を増加させるという報告が数多くされており<sup>42, 43)</sup>、本研究では、生の馬鈴薯粉末を投与した RP 群で顕著な SCFA の産生増加が認められ、とりわけ酪酸の産生は有意に高値を示した<sup>39)</sup>。また、酢酸やプロピオン酸の産生においても RP 群で他の乾燥馬鈴薯粉末添加群と比較して増加が認められた<sup>39)</sup>。また、次に RS を多く含む蒸気加熱加工をした SP 群においても SCFA の増加がみられた<sup>39)</sup>。またこれらは RS 総摂取量とかなり高い相関が認められた<sup>39)</sup> (Table 9)。*in vitro* 試験においても乾燥ポテト粉末添加群で SCFA レベルが cellulose 添加群と比較して顕著に増加した。SCFA の産生は、pH の低下、アンモニア、フェノールの生産減少、二次胆汁酸の排泄減少、細菌活性減少に関連している<sup>44)</sup>。本研究では、RP 群や他の乾燥馬



铃薯粉末群でラットの盲腸内 pH の顕著な低下がみられ、 *in vitro* 試験においても培養液の pH が顕著に低下した。

RS の摂取は *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* を増加させるという報告がある<sup>45)</sup>。本研究においては、 *in vitro* 試験で、とくに *Lactobacillus* と *Bifidobacterium* が cellulose 添加群と比較して乾燥馬铃薯粉末添加群で顕著に増加した。 *in vivo* 試験では、 Anaerobe, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* および Lactic acid bacteria が、 RP 群で他の乾燥馬铃薯粉末群と比較して顕著に増加し、 SP 群でも Lactic acid bacteria が顕著に増加した<sup>39)</sup>。また、 pH の低下は *Clostridium* など有害菌の増加を抑制する働きがある<sup>2)</sup>。本研究において、有害菌である Coliform は、 *in vitro* 試験において培養開始 24 時間以降、とくに RP 群で cellulose 群に対し顕著な低下が認められた。しかしながら今回ラットの盲腸内にける Coliform レベルは RP 群や他の乾燥ポテト粉末群で増加した<sup>39)</sup>。本研究の実験食投与期間は 4 週間であるが、長期投与であれば Coliform は減少した可能性も考えられる。馬铃薯デンプン (RS2) を 10% 添加した食餌を長期間投与したラットの盲腸において、5 ヶ月目で Enterobacteria が減少した報告もされている<sup>46)</sup>。

*in vitro* 試験において、アンモニア濃度は、 cellulose 群に対し有意に低下した。腸管内でのアンモニアの産生機序の一つは、食事由来のアミノ酸が大腸菌などの腸内細菌によって分解されることによる<sup>47)</sup>。本研究では、とくに RS 含量の高い RP 群で顕著に低下し、これは Coliform レベルの減少と一致している。

RS の摂取は血漿および肝臓中のコレステロールを低下させるという報告は数多くされており、 Fukushima ら (2009 年) は、小豆、金時、手亡の煮豆中の RS が、ラットの盲腸内 SCFA を増加させ、糞便中中性ステロール排泄量を増加させる可能性を示唆し、さらに胆汁酸排泄量の増加、血中中性脂肪の有意な低下が確認されている<sup>48)</sup>。本研究では、ラットにおいて、血中および肝臓中のコレステ

ロールレベルの低下は認められなかったが、血中中性脂肪および遊離脂肪酸レベルが、RS 含量の最も高い RP 群で有意に低下していた<sup>39)</sup>。大腸内発酵により産生される SCFA が脂質代謝に影響し、肝臓や小腸におけるコレステロール合成抑制に有効であるという報告がある<sup>49)</sup>。また、SCFA が交感神経系を刺激し、ノルアドレナリンの分泌を促進することでエネルギー消費を高め、肥満を抑制することや、白色脂肪細胞においてインスリンシグナルを抑制し、脂肪蓄積を抑制することが報告されている<sup>50,51)</sup>。

本研究では、乾燥馬鈴薯粉末製造過程における RS 量およびその消化性の変化に伴う腸内発酵および脂質代謝への影響を検討した。その結果、生の馬鈴薯には RS が最も多く存在しており、そのプレバイオティクス効果から、血中遊離脂肪酸濃度や中性脂肪濃度の有意な低下を示した。湿熱処理過程においてはスチーム加工における冷却工程が RS 量を増加させ、その連続的な投与による短鎖脂肪酸の増加により腸内環境を改善し血中の中性脂肪を低下させる可能性を示唆している。

Table 9. Relationship between total resistant starch intakes and cecal SCFA contents.

Variable	Correlation (r)
Acetic acid	0.732***
Butyric acid	0.902***
Propionic acid	0.742***
Total SCFA	0.783***

\*\*\* indicates  $p < 0.001$ ,  $n=25$

## 総合考察

近年わが国では、食習慣の変化などによる各種生活習慣病の拡大が深刻な問題となっている。そのため日常の食生活を通じた健康維持・増進・疾病の予防についての関心が高まってきている。北海道十勝地方は日本有数の農業地帯であり、恵まれた気候や土地資源を活かし様々な農作物が生産されている。日本の農業の低迷が懸念される中、十勝地域における農業の発展に大きな期待が寄せられる。現在北海道十勝地方で生産される農産物や加工品の栄養成分や健康機能性評価に関する報告は多くなく、それらの探索、分析、作用メカニズムの解明および評価方法の確立はまだ十分にされていない。そこで本研究では国民の健康維持・増進に寄与するとともに、十勝産農産物の付加価値向上による北海道の一次産業の活性化を目的とし、北海道十勝地域で生産される農産物由来の食品成分の健康機能性について検討した。

第1章で、ベタインのNASH（非アルコール性脂肪性肝炎）誘発マウスに対する影響について検証したところ、肝細胞の膨化や壊死の顕著な抑制が観察され、肝細胞における脂肪沈着が顕著に抑制されることが明らかとなった。

飽食のわが国では、肥満人口の増加により脂肪肝やNASH患者は著しく増加している。しかしNASHには現在のところ確立した治療法がなく、適応した治療薬は承認されていない。NASHの進行を促すメカニズムについては、多くの仮説が提案されているがまだほとんどが解明されていない。ベタイン投与は、NASH病態進行を促す脂肪蓄積を抑制することによるNASHの予防効果が期待できる。進行の初期段階で制御できるため、治療に有効的に用いることができるかもしれない。しかしながらそのメカニズム解明にはさらなる検討が必要

であり、ヒト介入試験により、ヒトにおける予防効果および安全性の検証も課題である。

第2章で、十勝産の2種のマッシュルーム（ホワイト種，ブラウン種）の腸内発酵および脂質代謝への影響を，*in vitro* および *in vivo* 試験により調査した。その結果，ホワイトマッシュルームはブラウンマッシュルームよりも水溶性食物繊維や難消化性糖質の含量が高く，それにより有害菌の増殖抑制や短鎖脂肪酸生成量の増加が顕著であり，それらの腸内環境改善効果を通じて，脂質代謝に対しても有用な効果を持つことが示唆された。ブラウンマッシュルームにおいても，その不溶性食物繊維の効果により糞便の嵩を増やし，プレバイオティクス効果が期待できる。しかしながら，詳細な作用メカニズムの解明は達成されておらず，食物繊維の構成成分や難消化性物質などの定量分析を行う必要がある。近年では十勝地域においてマッシュルームは意外性のある農作物として受け入れられ，「とちまこマッシュ」<sup>1)</sup>として全国にも広く認知されてきている。今後さらなる消費拡大や差別化を図る上でこのような機能性評価は有効かもしれない。

第3章では，馬鈴薯の加工品の一つである乾燥馬鈴薯粉末製造工程における，各段階の馬鈴薯粉末について，*in vitro* および *in vivo* 試験によって腸内発酵および脂質代謝への影響を比較した。加熱加工中に産生するレジスタントスターチはラットの腸内有用菌の増殖を促し，それは *in vitro* 試験の結果とも一致した。さらに乾燥馬鈴薯粉末は，加熱加工工程でレジスタントスターチ含量が変化し，ブランチングにより低下したレジスタントスターチはスチーム加工における冷却工程によって増加した。それによりラットの盲腸内短鎖脂肪酸産生量を増加させ腸内環境を改善し，血中の中性脂肪を低下させた。十勝地域の基幹作物であり，利用用途の広い馬鈴薯において，新規の機能性を明らかにするこ

とによって新たな需要を創出でき、馬鈴薯生産のさらなる拡大につながる  
ことが期待できる。

本研究におけるこれらの成果が、十勝地域産農産物の付加価値向上につな  
がり、今後これらの新規な知見が食品産業において有用な加工利用に応用され  
ることが期待される。しかしながら作用メカニズムなど不明な点も多々あり、そ  
れらの分析を進めるとともに、最終的なヒトへの効果や安全性を明確にするこ  
とが今後の課題である。

## 要約

本研究では、北海道十勝で生産される農産物由来の食品成分の健康機能性、とくに腸内発酵および脂質代謝への影響について検討した。

第 1 章では、北海道十勝産ビートから生産される砂糖の副産物中の機能性成分ベタインの新規な機能性および作用メカニズムの解明を目的とし、NASH モデルマウスを用い NASH に対する効果、とくに予防効果について検討した。その結果、ベタイン摂取によって NASH モデルマウスの肝細胞の膨化や壊死の顕著な抑制が観察され、肝細胞における脂肪沈着が顕著に抑制されることが明らかとなった。したがって NASH モデルマウスにおいて、ベタインは脂肪肝の改善効果また NASH 進行の初期において予防効果が示唆された。

第 2 章では、2 種のマッシュルーム（ブラウン種，ホワイト種）の 2 種間での機能性の比較、とくに腸内環境と脂質代謝への影響について *in vitro* および *in vivo* 試験により検証した。2 種のマッシュルーム、とくにホワイトマッシュルームは有害菌の増殖抑制や短鎖脂肪酸生成量の増加が顕著であり、それらの腸内環境改善効果を通じて脂質代謝に対しても有用な効果を持つことが示唆された。

第 3 章では、馬鈴薯の加工品の一つである乾燥馬鈴薯粉末製造工程における各段階の乾燥馬鈴薯粉末 4 種類（生馬鈴薯，ブランチ，スチームおよびドラムドライ加工馬鈴薯粉末）について *in vitro* および *in vivo* 試験において腸内発酵および脂質代謝への影響を比較した。加熱加工中に産生するレジスタントスターチは腸内有用菌の成長を促し、ブランチングやドラムドライ加工よりも、スチーム加工によってレジスタントスターチを増加させ、それによる盲腸内短鎖脂肪酸

の増加により腸内環境を改善し血中の中性脂肪を低下させる可能性が示唆された。

今回本研究において、十勝産農産物および加工・副産物中の有効成分の新規な健康機能が明らかになった。このことは十勝産農産物の付加価値向上につながり、今後これらの新規な知見が食品産業において有用な加工利用に応用されることが期待される。



## Abstract

In this study, I examined the health benefits of food ingredients derived from agricultural products that are produced in Tokachi, Hokkaido.

In Chapter 1, I inspected the effect of betaine on non-alcoholic lipid hepatitis (NASH) induction mouse. Betaine, a non-sugar compound, is a byproduct obtained during the process of manufacturing sugar from beets produced in Tokachi. Five-week-old NASH model mice were administered an oral dose of betaine solution twice a day for 3 weeks, and distilled water was administered as a control treatment. Blood was collected on the last day of dosage and an autopsy was performed for collecting and analyzing the liver. Considerable changes were not observed in the blood biochemistry and total liver glutathione estimations in betaine-fed mice, compared to the control mice. However, a considerable rise in liver to body weight ratio, and remarkable restraint over HE dyeing, hepatocellular swelling, and necrosis were observed; oil red O staining confirmed that the fat composition in hepatocytes was restrained conspicuously. Thus, betaine attenuated the symptoms of fatty liver in NASH mouse model and has been suggested to exhibit NASH protective role.

In Chapter 2, I investigated the enteral fermentation of two kinds of mushrooms (white class and brown class) and the subsequent lipid metabolism by *in vitro* and *in vivo* examinations. An *in vitro* examination after 12 hours of treatment indicated that a low pH was maintained in the mushroom powder-treated groups compared with the cellulose-treated groups, and an increase in Lactobacillus count was also observed. As time progressed, mushroom powder-treated cultures showed an increase in short chain fatty acids. However, *in vivo* examinations in rats revealed a remarkable increase in short chain fatty acids only in white mushroom group.

In addition, blood VLDL+IDL+LDL- cholesterol decreased conspicuously in white mushroom-fed rats, whereas a decrease in atherosclerosis index was observed in both the mushroom groups. Liver cholesterol decreased considerably; particularly, cholesterol excretion via feces increased remarkably in the brown mushroom-fed rats. A remarkable decrease in the growth of harmful bacteria and increase of the short chain fatty acid production were observed in both the mushroom-fed rats groups, particularly in white mushroom-fed rats; this indicates the positive effect of mushrooms on lipid metabolism via improvement of the enteral environment.

In Chapter 3, I studied the enteral fermentation of four types of dry potato powders, obtained from the four stages of dry potato powder manufacturing process (raw potato, blanch, steam, drum dry processing), and the subsequent lipid metabolism by in vitro and in vivo examinations. In vitro examination of 48-hour-old culture showed increased short chain fatty acid levels in all dry potato powder groups; however, these levels were comparatively higher in the raw potato group. In addition, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* counts increased significantly in dry potato powder-treated groups compared with the cellulose-treated group. Furthermore, the *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and Lactic acid bacterial counts increased significantly in the cecum of raw potato-fed rats, compared with the steam potato-fed rats. A remarkable increase in short chain fatty acid was observed in the resistant starch-rich raw potato and steam potato groups, compared to the control groups. In addition, a decrease in pH was observed in the cecum of all dry potato powder-fed rats, compared with the control rats. The blood triglyceride concentration decreased in all dry potato powder-fed rats; however, comparatively higher reduction was observed in those fed raw potato. These findings suggest that the blanching and drum-drying steps produce regenerated Resistant starch (RS) as retrograded starch which is not healthy, and RS produced during the heating process and the post-cooling steaming step in the cooking process, promoted the enteral growth of useful

bacteria and increased the short-chain fatty acid content. Such steam treatment may therefore be useful for the development of potato products with health benefits.

## 参考文献

### 緒論

- 1) 厚生労働省 平成 26 年「患者調査」
- 2) 消費者庁「機能性表示食品に関する情報」
- 3) 農林水産省「耕地および作付面積調」
- 4) 農林水産省「作物統計」
- 5) 北海道農政部生産振興局農産振興課調べ「平成 27 年度てん菜糖の生産実績」
- 6) Fassler C, Arrigoni E, Venema K, Hafner V, Brouns F, Amado R. (2006) Digestibility of resistant starch containing preparations using two in vitro models. *Eur J Nutr* **45**: 445–453.
- 7) Cherrington CA, Hinton M, Pearson GR, Chopra I. (1991) Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp without causing membrane perturbation. *J Appl Bacteriol* **70**: 161–165.
- 8) Aller R, de Luis DA, Izaola O, La Calle F, del Olmo L, Fernandez L, Arranz T, Hernandez JM. (2004) Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose levels in healthy

subjects: a randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract* **65**: 7–11.

9) Han KH, Fukushima M, Shimizu K, Kojima M, Ohba K, Tanaka A, Shimada KI, Sekikawa M, & Nakano M. (2003) Resistant starches of beans reduce the serum cholesterol concentration in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **49**: 281–286.

10) Han KH, Hayashi N, Hashimoto N, Shimada KI, Sekikawa M, Noda T, & Fukushima M. (2008) Feeding potato flakes affects cecal short-chain fatty acids, microflora and fecal bile acids in rats. *Ann Nutr Metab* **52**: 1–7.

## 第 1 章

1) Virtanen E.(1995) Piecing together the betaine puzzle. *Feed Mix* **3**: 12–7

2) 佐藤真一, 恵本司, 菅野恭志. (2000) ベタインの食品素材としての特性, 月刊フードケミカル 16: 81–85.

3) Craig SAS. (2004) Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr* **80**: 539–549.

4) Su S, Dodson M, Li XB, Li QF, Wang HW & Xie Z. (2009) The effects of dietary betaine supplementation on fatty liver performance, serum parameters, histological changes, methylation status and the mRNA expression level of Spot14[alpha] in Landes goose fatty liver. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* **154**: 308–314.

- 5) Lever M, Sizeland PC, Bason LM, Hayman CM, Robson RA & Chambers ST. (1994) Abnormal glycine betaine content of the blood and urine of diabetic and renal patients. *Clinica Chimica Acta* **230**: 69–79.
- 6) Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **346**: 476–83.
- 7) Yagisawa M, Doi Y, Uenohara T, Toda M, Shigematsu N & Nakata R. (2006) Betaine supplementation suppresses plasma homocysteine level elevation induced by folate deficiency in rats. *Nutr Res.* **26**: 266–270
- 8) Beretich Jr, G. (2007) Betaine may act as a fast-acting antipsychotic by rapidly reducing blood levels of homocysteine. *Med Hypotheses* **69**: 465–466.
- 9) Atkinson W, Slow S, Elmslie J, Lever M, Chambers ST & George PM. (2009) Dietary and supplementary betaine: Effects on betaine and homocysteine concentrations in males. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **19**: 767–773.
- 10) Schwahn BC, Wang XL, Mikael LG, Wu Q, Cohn J, Jiang H, Maclean KN & Rozen R. (2007) Betaine supplementation improves the atherogenic risk factor profile in a transgenic mouse model of hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* **195**: e100–e107.
- 11) Okada T, Kawakami S, Nakamura Y, Han KH, Ohba K, Aritsuka T, et al. (2011) Amelioration of D-galactosamine-induced acute liver injury in rats by dietary

supplementation with betaine derived from sugar beet molasses. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 1335–1341.

12) Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic Jukic L, Velagic V. (2007) Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **13**: 4539–4550.

13) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. (1980) Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* **55**: 434–438.

14) Lee RG. (1989) Nonalcoholic steatohepatitis: A study of 49 patients. *Hum Pathol* **20**: 594–598.

15) Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, et al. (1990) The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: A follow-up study of 42 patients for up to 21 years. *Hepatology* **11**: 74–80.

16) McCullough AJ. (2005) The epidemiology and risk factors of NASH. In: Farrell GC, George J, Hall P, McCullough AJ, eds. Fatty liver disease: NASH and related disorders. Malden, MA: *Blackwell Publishing* 23–37.

17) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* **116**: 1413–1419.

- 18) Attar BM, Van Thiel DH. (2013) Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. *Sci World J* 481893.
- 19) Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. (2007) Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition, *J Nutr Biochem* 18184–18195.
- 20) Ibrahim MA, Kelleni M, Geddawy A. (2013) Nonalcoholic fatty liver disease: current and potential therapies. *Life Sci* **92**: 114–118.
- 21) Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, Honma T, Hashiguchi T, Sakurai M, Furuuchi M, Nishimura N, Suzuki K, Ichida T, Yoneyama H. (2012) A novel murine model recapitulates the pathogenesis of human non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related hepatocellular carcinoma. *Digestive Disease Week Poster Su* 1958, program p. 347.
- 22) Ji C, Kaplowitz N. (2003) Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* **124**:1488–99.
- 23) National Research Council (1985) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Institute of Health Publication no. 85-23, revised ed., Washington, DC: National Academy of Science.



- 24) Cohn VH, Lyle J. (1966) A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* **14**: 434–440.
- 25) Bingül İ, Aydın AF, Başaran-Küçükgergin C, Doğan-Ekici I, Çoban J, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. (2016) High-fat diet plus carbon tetrachloride-induced liver fibrosis is alleviated by betaine treatment in rats. *Int Immunopharmacol* **39**: 199–207.
- 26) Kawakami S, Han KH, Nakamura Y, Shimada K, Kitano T, Aritsuka T, Nagura T, Ohba K, Nakamura K, Fukushima M. (2012) Effects of dietary supplementation with betaine on a nonalcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model. *J Nutr Sci Vitaminol* **58**: 371–375.
- 27) Kwon do Y, Jung YS, Kim SJ, Park HK, Park JH, Kim YC. (2009) Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats. *J Nutr* **139**: 63–68.
- 28) Mudd SH, Poole JR. (1975) Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* **24**: 721–735.
- 29) Avila MA, Berasain C, Torres L, Martín-Duce A, Corrales FJ, Yang H, Prieto J, Lu SC, Caballería J, Rodés J, Mato JM. (2000) Reduced abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **33**: 907–914.

- 30) Evans PJ, Whiteman M, Tredger JM, Halliwell B. 1997. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. *Free Radic Biol Med* **23**: 1002–1008.
- 31) Kathirvel E, Morgan K, Nandgiri G, Sandoval BC, Caudill MA, Bottiglieri T, French SW, Morgan TR. (2010) Betaine improves nonalcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: a potential mechanism for hepatoprotection by betaine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**: G1068–1077.
- 32) Barak AJ, Beckenhauer HC, Junnila M, Tuma DJ. (1993) Dietary betaine promotes generation of hepatic S-adenosylmethionine and protects the liver from ethanol-induced fatty infiltration. *Alcohol Clin Exp Res* **17**: 552–555.
- 33) Lu SC, Tsukamoto H & Mato JM. (2002) Role of abnormal methionine metabolism in alcoholic liver injury. *Alcohol* **27**: 155–162.
- 34) Kim SK, Kim YC. (2005) Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *J Hepatol* **42**: 907–913.
- 35) Kim SK, Choi KH, Kim YC. (2003) Effect of acute betaine administration on hepatic metabolism of S-amino acids in rats and mice. *Biochem Pharmacol* **65**: 1565–1574.
- 36) Kim SK, Seo JM, Jung YS, Kwak HE, Kim YC. (2003) Alterations in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids induced by ethanol in rats. *Amino Acids* **24**:

103–110.

37) Yoshida M, Hara I. (1985) Variation of cysteine level by chlorobenzeneinduced perturbation of glutathione metabolism in rat liver. *J Nutr Sci Vitaminol* **31**: 69–76.

38) Lieber CS, DeCarli LM. (1966) Study of agents for the prevention of the fatty liver produced by prolonged alcohol intake. *Gastroenterology* **50**: 316–322.

39) Lieber CS, Casini A, DeCarli LM, et al. (1990) S-adenosylmethionine attenuates alcohol induced liver injury in the baboon. *Hepatology* **11**: 165–172.

40) Sidransky H, Farber E. (1960) Liver choline oxidase activity in man and several species of animals. *Arch Biochem Biophys* **5**: 129–133.

41) Bilici A, Unsal B. (1999) Laboratory predictors of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatology* **30**: 438A.

42) Leclercq IA, Field J, Bell DR, Farrell GC and Robertson GR. (1999) Involvement of CYP2E1 and CYP4A in the pathogenesis of experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **30**: p.1055.

43) Kugelmas M, Vivian B and Glass J, et al. (1999) Cytokine profiles in NASH. *Gastroenterology* **116**: p.A1234.

- 44) Perez-Carrera M, DelHoyo P and Martin MA, et al. (1999) Activity of the mitochondrial respiratory chain enzymes is decreased in liver of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **30**: p.379A.
- 45) Soltys KA, Prescott L and Koneru B, et al. (1999) Evidence supporting increased basal oxidative stress and impaired antioxidant defenses in fatty livers. *Hepatology* **30**: p. 279A.
- 46) Pera N, Phung N and Farrell GC, et al. (1999) Oxidative stress in hepatic fibrogenesis. *Hepatology* **30**: p.493A.
- 47) Jung YS, Kim SJ, Kwon DY, Ahn CW, Kim YS, Choi DW, Kim YC. (2013) Alleviation of alcoholic liver injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. *Food Chem Toxicol* **62**: 292–298.
- 48) Kim SK, Seo JM, Chae YR, Jung YS, Park JH & Kim YC. (2009) Alleviation of dimethylnitrosamine-induced liver injury and fibrosis by betaine supplementation in rats. *Chem Biol Interact* **177**: 204–211.
- 49) Yao ZM, Vance DE. (1988) The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem* **263**: 2998–3004.
- 50) Ridgway ND, Vance DE. (1988) Kinetic mechanism of phosphatidylethanolamine N-

methyltransferase. *J Biol Chem* **263**: 16864-16871.

51) Olthof MR, Vliet TV, Verhoef P, Zock PL, Katan MB. (2005) Effect of homocysteine-lowering nutrients on blood lipids: results from four randomized, placebo-controlled studies in healthy humans. *PLoS Med* **2**: 446-456.

52) Song Z, Deaciuc I, Zhou Z, Song M, Chen T, Hill D, McClain CJ. (2007) Involvement of AMP-activated protein kinase in beneficial effects of betaine on high-sucrose diet-induced hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**: G894-G902

## 第 2 章

1) Macfarlane GT, Cummings JH. (1991) The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. *physiology, pathophysiology and disease*. (Phillips SF, Pemberton JH, Shorter RG, eds).51–92.

2) Bingham SA. (1999) High-meat diets and cancer risk. *Proc Nutr Soc* **58**: 243–248.

3) Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. (2011) Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **472**: 57–63.

4) Sims J, Renwick A. (1985) The microbial-metabolism of tryptophan in rats fed a diet containing 7.5-percent saccharin in a 2-generation protocol. *Fd Chem Toxic* **23**: 437–444.

- 5) Sims J, Renwick A. (1983) The effects of saccharin on the metabolism of dietary tryptophan to indole, a known cocarcinogen for the urinary-bladder of the rat. *Toxic Appl Pharmac* **67**: 132–151.
- 6) Anderson RI, Lefever FR, Miller NS, Maurer JK. (1989) Comparison of the bladder response to indole and sodium saccharin ingestion by male rats. *Fd Chem Toxic* **27**: 777–779.
- 7) 光岡知足 (1990) 腸内細菌学, p.307, 朝倉書店, 東京
- 8) Goldin BR. (1986) In situ bacterial metabolism and colon mutagens. *Annual Review of Microbiology* **40**: 367–393.
- 9) 江頭祐嘉合, 長南治 (2005) 食物繊維とがん, 日本食物繊維学会誌, **9**: 1–11.
- 10) Yamashita S, Yamashita K, Yasuda H. (1980) High-fiber diet in the control of diabetes in rats. *Endocrinologia Japonica* **27**: 169–173.
- 11) Fukushima M, Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K, Nakano M. (2001) Cholesterol-Lowering Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) Fiber, Shiitake (*Lentinus edodes*) Fiber, and Enokitake (*Flammulina velutipes*) Fiber in Rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**: 758–65.
- 12) Liu J, Jia L, Kan J, Jin CH. (2013) In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic

extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology* **5**: 310–316.

13) Ozturk, M, Duru ME, Kivrak S, Mercan-Dogan N, Turkoglu A, Ozler, MA. (2011) In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem Toxicol* **49**: 1353–1360.

14) Koyyalamudi SR, Jeong SC, Cho KY, et al. (2009) Vitamin B12 is the active corrinoid produced in cultivated white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Agric Food Chem* **57**: 6327–6333.

15) Yu S, Weaver V, Martin K, et al. (2009) The effects of whole mushrooms during inflammation. *BMC Immunol* **10**:12.

16) Sultan Md, Ahmad, S, Brijraj G, et al. (2013) Antigenotoxic and anticlastogenic potential of *Agaricus bisporus* against MMS induced toxicity in human lymphocyte cultures and in bone marrow cells of mice. *Egypt J Med Hum Genet* **14**: 395–402.

17) Jeong SC, Jeong YT, Yang BK, Islam R, Koyyalamudi SR, Pang G, Cho, KY, Song CH. (2010) White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutr Res* **30**: 49–56.

18) Fukushima M, Nakano M, Morii Y, Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K (2000)

Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. *J Nutr* **130**: 2151–2156.

19) Mitsuoka T, Ohno K, Benno Y, Suzuki K, Namba K (1976) The faecal flora of man. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* **234**: 219–233.

20) Mitsuoka T, Segi T, Yamamoto S (1964) A new selective medium for Bacteroides. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* **195**: 69–79.

21) Mitsuoka T, Segi T, Yamamoto S. (1965) Improved methodology of qualitative and quantitative analysis of the intestinal flora of man and animals. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* **195**: 455–469.

22) Wada A, Bonoshita M, Tanaka Y, Hibi K. (1984) A study of a reaction system for organic acid analysis using a pH indicator as post-column reagent. *J chromatog A* **291**: 111–118.

23) 奥田拓道, 藤井節郎 (1966) 血中アンモニア直接比色定量法最新医学, **21**: 622–627.

24) National Research Council (1985) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Institute of Health Publication no. 85-23, revised ed., Washington, DC: National Academy of Science.



- 25) Matsubara Y, Sawabe A, Iizuka Y. (1990) Structures of new linoroid glycosides in lemon (*Citrus limon* Burm. f.) peelings. *Agric Biol Chem* **54**: 1143–1148.
- 26) Grundy SM, Ahrens EH, Jr, Miettinen TA. (1965) Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total fecal bile acids. *J Lipid Res* **6**: 397–410.
- 27) Feldman GM, Ickes JW. (1997) Net hydrogen and potassium fluxes across the apical surface of distal rat colon. *Am J Physiol* **272**: 54–62.
- 28) Malhotra SL. (1982) Faecal urobilinogen levels and pH of stools in population groups with different incidence of cancer of the colon, and their possible role in its aetiology. *J R Soc Med* **75**: 709–714.
- 29) Sliva D, Loganathan J, Jiang J, et al. (2012) Mushroom *Ganoderma lucidum* prevents colitis-associated carcinogenesis in mice. *PLoS One* **7**: e47873.
- 30) Wong KH, Katsumata S, Masuyama R, et al. (2006) Dietary fibers from mushroom sclerotia. 4. In vivo mineral absorption using ovariectomized rat model. *J Agric Food Chem* **54**: 1921–1927.
- 31) Cheung PCK. (2013) Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: preparation and health benefits. *Food Sci Hum Well* **2**: 162–166.
- 32) Shimizu J, Tsuchihashi N, Kudoh K, Wada M, Takita T, and Innami S. (2001) Dietary

curdlan increases proliferation of bifidobacteria in the cecum of rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 466–469.

33) Shen Q, Zhao L, Tuohy KM. (2012) High-level dietary fibre up-regulates colonic fermentation and relative abundance of saccharolytic bacteria within the human faecal microbiota in vitro. *Eur J Nutr* **51**: 693–705.

34) 牛田一成 (2005) プレバイオティクスやプロバイオティクスの効果は乳酸利用性細菌に依存する. *Foods Food Ingredients J* **210**.

35) Goldin BR, Gorbach SL (1976) The relationship between diet and rat fecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* **57**: 371–375.

36) Kawakami S, Araki T, Ohba K, Sasaki K, Kamada T, Shimada KI, Han KH, Fukushima M. (2016) Comparison of the effect of two types of whole mushroom (*Agaricus bisporus*) powders on intestinal fermentation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **80**: 2001–2006.

37) 辻 啓介, 森 文平編 (1997) 食物繊維の化学. 朝倉書店, 東京.

38) Topping DL. (1991) Soluble fiber polysaccharides: effects on plasma cholesterol and colonic fermentation. *Nutr Rev* **49**: 195–203.

39) Marlett JA, McBurney MI, Slavin JL (2002) Position of the American Dietetic

Association: Health implications of dietary fiber. *Am J Dietetic Association* **102**: 933–1000.

40) Nishina PM, Freedlard RA. (1990) Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr* **120**: 668–671.

41) Wright RS, Anderson JW, Bridges SR. (1990) Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **195**: 26–29.

42) Wolever TMS, Spadatoro PJ, Cunnane SC, Pencharz PB. (1995) Propionate inhibits incorporation of colonic [1, 2-<sup>13</sup>C] acetate into plasma lipids in humans. *Am.J Clin.Nutr* **61**: 1241–1247.

43) Fernandez ML (2001) Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol* **12**: 35–40.

44) Wrick KL, Robertson JB, Vansoest PJ, Lewis BA, Rivers JM, Roe DA, Hackler LR. (1983) The influence of dietary fiber source on human intestinal transit and stool output. *J Nutr* **113**: 1464–1479.

45) Yang JH, Lin HC, Mau JL. (2001) Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chem* **72**: 465–471.

46) 奥恒行 (2005) 難消化性糖質の消化・発酵・吸収ならびに許容量に関する研究. 日本栄養・食糧学会誌. **58**: 337–342.

47) Xiao J, Li X, Min X, Sakaguchi E. (2013) Mannitol improves absorption and retention of calcium and magnesium in growing rats. *Nutr* **29**: 325–331.

48) Morita T, Oh-hashii A, Takei K, Ikai M, Kasaoka S, and Kiriyaama S. (1997) Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet. *J Nutr* **127**: 470–477.

49) Shin MS, Lee S, Lee KY, Lee HG. (2005) Structural and biological characterization of aminated-derivatized oat β-glucan, *J Agric Food Chem* **53**: 5554–5558.

50) Gao S, Lai CKM, Cheung PCK. (2009) Nondigestible carbohydrates isolated from medicinal mushroom sclerotia as novel prebiotics. *Int J Med Mushrooms* **11**:1–8.

### 第 3 章

1) Englyst HN, Kingman SM, Hudson GJ, Cummings JH. (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr* **46**: S33–S50.

2) Fassler C, Arrigoni E, Venema K, Hafner V, Brouns F, Amado R. (2006) Digestibility of resistant starch containing preparations using two in vitro models. *Eur J Nutr* **45**: 445–453.

- 3) Cherrington CA, Hinton M, Pearson GR, Chopra I. (1991) Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp without causing membrane perturbation. *J Appl Bacteriol* **70**: 161–165.
- 4) Aller R, de Luis DA, Izaola O, La Calle F, del Olmo L, Fernandez L, Arranz T, Hernandez JM. (2004) Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose levels in healthy subjects: a randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract* **65**: 7–11.
- 5) Wolever TM, Spadafora PJ, Cunnane SC, Pencharz PB. (1995) Propionate inhibits incorporation of colonic [1, 2-<sup>13</sup>C] acetate into plasma lipids in humans. *Am J Clin Nutr* **61**: 1241–1247.
- 6) Englyst HN, Kingman SM, Hudson GJ, Cummings JH. (1996) Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *Br J Nutr* **75**: 749–755.
- 7) Mitsuoka T. (1996) Intestinal flora and human health. *Asia Pacific J Clin Nutr* **5**: 2–9.
- 8) Topping DL, Clifton PM. (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* **81**: 1031–1064.
- 9) Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN. (1996) Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br J Nutr* **75**: 733–747.

- 10) Qian Y, Li GJ, Zhu K, Suo HY, Sun P and Zhao X. (2013) Effects of three types of resistant starch on intestine and their gastric ulcer preventive activities in vivo. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **56**: 739–746.
- 11) Noda T, Takigawa S, Matsuura-Endo C, Suzuki T, Hashimoto N, Kottarachchi NS, Yamauchi H, Zaidul SMI. (2008) Factors affecting the digestibility of raw and gelatinized potato starches. *Food Chem* **110**: 465–470.
- 12) Zhang B, Dhital S, Flanagan BM, Gidley MJ. (2014) Mechanism for starch granule ghost formation deduced from structural and enzyme digestion properties. *J Agric Food Chem* **6**: 760–771.
- 13) Hizukuri S. (1969) The effect of environment temperature of plants on the physicochemical properties of their starches. *J Jpn Soc Starch Sci* **17**: 73–88.
- 14) Absara N, Zaidula ISM, Takigawaa S, Hashimoto N, Matsuura-Endo C, Yamauchia H, Noda T. (2009) Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amounts of bound phosphorus. *Food Chem* **112**: 57–62.
- 15) Kumasaka H, Uchida M, Kusaka K, Yoshioka K and Okada S. (1995) Inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharides prepared from potato starch on the formation calcium phosphate. *Biosci Biotech Biochem* **59**: 1412–1416.

- 16) Karim AA, Toon LC, Lee VPL, Ong WY, Fazilah A, Noda T. (2007) Effects of phosphorus contents on the gelatinization and retrogradation of potato starch. *J Food Sci* **72**: C132–C138.
- 17) Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. (2006) Resistant starch – a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **5**: 1–17.
- 18) Kasote DM, Nilegaonkar SS, Agte VV. (2014) Effect of different processing methods on resistant starch content and in vitro starch digestibility of some common Indian pulses. *J Sci Ind Res* **73**: 541–546.
- 19) Han KH, Hayashi N, Hashimoto N, Shimada KI, Sekikawa M, Noda T, & Fukushima M. (2008) Feeding potato flakes affects cecal short-chain fatty acids, microflora and fecal bile acids in rats. *Ann Nutr Metab* **52**: 1–7.
- 20) Kjeldahl J. (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *J Z Anal Chem* **22**: 366–382.
- 21) Mitsuoka T, Ohno K, Benno Y, Suzuki K, Namba K (1976) The faecal flora of man. *Zentralbl Bakteriol Orig A* **234**: 219–233.
- 22) Mitsuoka T, Sega T, Yamamoto S (1964) A new selective medium for Bacteroides. *Zentralbl Bakteriol Orig A* **195**: 69–79.

- 23) Mitsuoka T, Segal T, Yamamoto S (1965) Improved methodology of qualitative and quantitative analysis of the intestinal flora of man and animals. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* **195**: 455–469.
- 24) Wada A, Bonoshita M, Tanaka Y, Hibi K (1984) A study of a reaction system for organic acid analysis using a pH indicator as post-column reagent. *J chromatogr A* **291**: 111–118.
- 25) 奥田拓道, 藤井節郎 (1966) 血中アンモニア直接比色定量法最新医学, **21**: 622–627.
- 26) Fouad N. Boctor, Hemmat H. Ragher, Mamdouh Y. Kamel, R.R. Hamed (1978) A colorimetric method for the determination of indole, and its application to assay of tryptophanase. *Anal Biochem* **86**: 457–462.
- 27) National Research Council (1985) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Institute of Health Publication no. 85-23, revised ed., Washington, DC: National Academy of Science.
- 28) Matsubara Y, Sawabe A, Iizuka Y. (1990) Structures of New Linoroid Glycosides in Lemon. *Agric Biol Chem* **54**: 1143–1148.
- 29) Grundy SM, Ahrens EH, Jr, Miettinen TA. (1965) Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total fecal bile acids. *J Lipid Res* **6**: 397–410.



- 30) Nugent AP. (2005) Health properties of resistant starch. *Nutr Bull* **30**: 27–54.
- 31) Brown IL, Warhurst M, Arcot J, Playne M, Illman RJ, Topping DL. (1997) Fecal numbers of bifidobacteria are high in pigs fed *Bifidobacterium longum* with a high amylose (amylomaize) starch than with a low amylomaize starch. *J Nutr* **127**:1822–1827.
- 32) Eerlingen RC, Crombez M, Delcour JA. (1993) Enzyme-resistant starch. I. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. *Cereal Chem* **70**: 339–344.
- 33) Haralampu S. (2000) Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS 3. *Carbohydr Polym* **41**: 285–292.
- 34) Kingman SM, Englyst HM. (1994) The influence of food preparation methods on the in vitro digestibility of starch in potatoes. *Food Chem* **49**: 181–186.
- 35) Leeman AM, Bårström LM, Björck IME. (2005) In vitro availability of starch in heat-treated potatoes as related to genotype, weight and storage time. *J Sci Food Agric* **85**: 751–756.
- 36) Farhat IA, Protzmann J, Becker A, Vallès-Pàmies B, Neale R, Hill SE. (2001) Effect of the extent of conversion and retrogradation on the digestibility of potato starch. *Starch* **53**: 431–436.

- 37) Yadav AR, Guha M, Tharanathan RN, Ramteke RS. (2006) Changes in characteristics of sweet potato flour prepared by different drying techniques. *LWT –Food Sci Technol* **39**: 20–26.
- 38) Jane MA, William EB, Janet MJ. (1992) Protein quality of whole wheat as affected by drum-drying and single-screw extrusion. *J Agric Food Chem* **40**: 1943–1947.
- 39) Kawakami S, Han KH, Araki T, Ohba K, Wakabayashi T, Shimada KI, Fukushima M. (2016) Potato powders prepared by successive cooking-process depending on resistant starch content affect the intestinal fermentation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* (in press)
- 40) Le Blay G, Michel C, Blottière H, Cherbut C. (2003) Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *J Appl Microbiol* **94**: 312–320.
- 41) Roediger WEW. (1980) Role of the anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* **21**: 793–798.
- 42) Brouns F, Kettlitz B, Arrigoni E. (2002) Resistant starch and the butyrate revolution. *Trends Food Sci Technol* **13**: 251–261.

- 43) Le Blay G, Michel C, Blottiere HM, Cherbut C. (1999) Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *Br J Nutr* **82**: 419–426.
- 44) Young GP, Le Leu RK. (2004) Resistant starch and colorectal neoplasia. *JAOAC Int* **87**: 775–786.
- 45) Gibson GR, Wang X. (1994) Inhibitory effects of bifidobacteria on other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol* **77**: 412–420.
- 46) Kleessen B, Stoof G, Proll J, Schmiedl D, Noack J, Blaut M. (1997) Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short-chain fatty acids in rats. *J Animal Sci* **75**: 2453–2462.
- 47) 森下芳行 (1990) 腸内フローラの構造と機能, 朝倉書店
- 48) 福島道広, 岡田朋子, 韓圭鎬 (2009) 煮豆の効果 雑豆に含まれる難消化性デンプンは腸内環境および脂質代謝を改善させる? 日本食物繊維学会誌 **13**: 75–84.
- 49) Aller R, de Luis DA, Izaola O, La Calle F, del Olmo L, Fernandez L, Arranz T, Hernandez JM. (2004) Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose levels in healthy subjects: a randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract* **65**: 7–11.

50) Kimura I, Inoue D, Hirano K, Tsujimoto G. (2014) The SCFA receptor GPR43 and energy metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**; 85.

51) Hara T, Kashihara D, Ichimura A, Kimura I, Tsujimoto G, Hirasawa A. (2014) Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1841**; 1292-1300.

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するにあたり、終始多くのご支援、ご指導を賜りました福島道広教授、韓圭鎬准教授、島田謙一郎准教授、浦島匡教授、宮本明夫教授、梅津一孝教授、西田武弘准教授、福田健二准教授に心より深く感謝申し上げます。

さらに本研究の遂行においてご協力いただきました福島・韓研究グループの卒業生ならびに大学院生、学部学生の皆様に感謝いたします。