

# 機能性糖質の研究の動向について -とくに機能性糖質のプレバイオティクス効果について-

帯広畜産大学食品科学研究部門

福島道広、中村有美、李 スルギ、土平洋彰、小林由佳  
川上秋桜、岡田朋子、島田謙一郎、韓 圭鎬

## 要 約

今回、我々は北海道十勝で生産された豆類やジャガイモ、新規作物として栽培開発を行っているチコリから難消化性糖質を分離、そのプレバイオティクス効果について検証した。

豆類では、澱粉の構造がレジスタントスターチタイプ2であり、この澱粉が加熱調理加工過程でタイプ3の老化澱粉とタンパク質の被膜が形成されることにより、消化性が低下する可能性が見い出された。その結果、ラットの盲腸内で酸発酵が増進し、短鎖脂肪酸の上昇とpHの低下が認められ、腸内環境を改善させることが明らかとなった。さらに、十勝の特産物であるジャガイモもエステル結合したリン酸基を持つ澱粉であり、レジスタントスターチタイプ2に分類される。この澱粉も加熱調理加工することによりタイプ3の老化澱粉が増加する可能性がある。このジャガイモ澱粉がラット盲腸内で短鎖脂肪酸量を増加させ、特に酪酸の総短鎖脂肪酸に対する比率の上昇は消化を刺激して、糞便重量を増加させることが明らかであり、酪酸の好材料であることが確認された。また、チコリ由来のイヌリンについても、十勝イヌリンが *in vivo* および *in vitro* 研究で盲腸内微生物叢、特に *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* レベルを上昇させ、総短鎖脂肪酸濃度も増加させることが明らかとなり、従来の報告と一致していた。

以上の結果より、豆類およびジャガイモのデンプンにはレジスタントスターチの作用を有しており、また十勝で新規に栽培したチコリ由来のイヌリンにも腸内改善効果が認められ、機能性糖質としてプレバイオティクス作用を持つことが明らかとなった。

## 緒 言

生活習慣病の予防としては日々の食生活において各栄養素をバランスよく摂取し、特に動脈硬化を防ぐためには脂質を過剰摂取しないことが肝要である。これは食品が動物体内の脂質代謝にさまざまな影響を及ぼしていることが広く知られてきており、摂取する食品成分の違いによって生体反応が異なってくるためである。その食品成分の中で、難消化性澱粉(レジスタントスターチ)の機能性に関する研究が急速に進んできている。レジスタントスターチは小腸での消化を免れるあらゆる澱粉と定義されており、現在物理的・化学的性質のうえから4種類に分類されている<sup>1)</sup>。その機能についても整腸作用<sup>2)</sup>、コレステロール低下作用<sup>3)</sup>などが知られており、Southgate<sup>4)</sup>は結腸に達して食物繊維と同様に働くとして食物繊維様食品成分の中に加えている。Englyst<sup>5)</sup>も生理学的に重要な意味を持つ物質群であることを認めている。

我々の研究室では、北海道十勝の農産物で

ある豆類やジャガイモの難消化性澱粉の機能性、特にプレバイオティクス効果についての検討を行った。豆類から餡を製造する過程で澱粉は加熱により糊化した状態になるが、これが冷やされることでレジスタントスターチである老化澱粉が生じてくる。さらに、その表面が熱変性したタンパク質により被覆された状態になる(図1)。このことは煮豆において難消化性澱粉が増加し、それに伴い消化酵素の分解を受けづらくなる食物繊維様作用が起こりうる可能性を示唆している。

また、ジャガイモ澱粉では、グルコース糖鎖中にエステル結合したリン酸基が、リン含量換算で500 ppm以上と、他の澱粉より明らかに多く存在する<sup>6)</sup>。さらに、ジャガイモ澱粉の消化の際には、リン酸基の近傍には澱粉分解酵素が作用できず、リン酸基を有するオリゴ糖が副生物として生じる<sup>7)</sup>。ジャガイモ澱粉においても、消化酵素の分解を受けづらくなる食物繊維様作用が起こりうる可能性を示唆している。

イヌリンはチコリの根やキクイモの塊茎に豊富に見出される貯蔵多糖である。イヌリンの分子構造はスクロースのフラクトース残基にフラクトース1~60分子が $\beta(2,1)$ 結合で直鎖

状に結合したものである。その鎖長には広い分散性があり、鎖長分布は植物種や植物のライフサイクルによって異なっている。そのイヌリンの生物学的な機能性としては、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* のような有益な菌の選択的な増殖および *Clostridium* などの有害菌の増殖抑制効果<sup>8)</sup>、やカルシウムなどのミネラル吸収促進効果<sup>9)</sup>、血清中性脂肪やLDLコレステロール低下などの脂質代謝改善効果<sup>10)</sup>などが報告されている。我々は十勝で栽培したチコリから難消化性多糖類のイヌリンの抽出およびそのプレバイオティクス効果について検討した。

本総説では、これら難消化性多糖類の機能性について解説する。

## 実験方法

### 1) 動物実験

実験1: 小豆、金時豆および手亡豆の澱粉画分を Åkerberg et al の方法<sup>11)</sup>にしたがって、未消化画分を調製した。

実験動物は7週齢の Fischer 系雄ラット(日本チャールス・リバー社、横浜)20匹を用い、明暗周期12時間(明期7:00~19:00)、室温 $23 \pm 1$  °C、湿度 $60 \pm 5$  %の条件で飼育した。

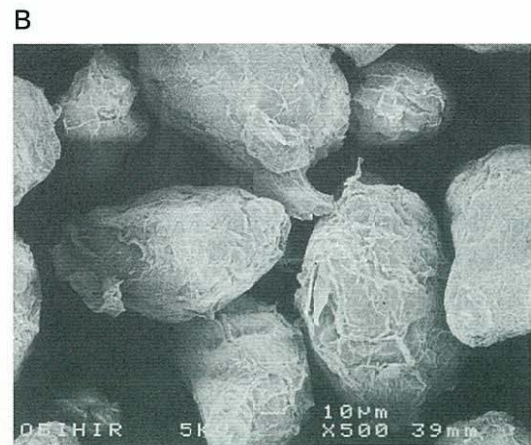
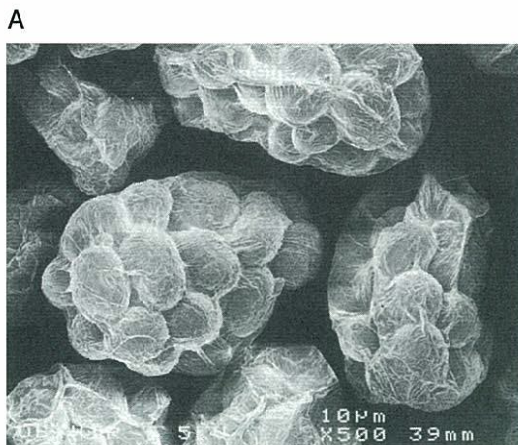


図1 SEM of raw starches (A) and boiled starches (B) of adzuki bean  
(Data of Hokkaido Tokachi Area Regional Food Processing Technology Center)

1週間市販の粉末飼料で馴化後、各投与群間で体重差がでないように4群に分けた。ラットの取り扱いは、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に準じて行った<sup>12)</sup>。

投与群はそれぞれ、AIN-93Gを基準食として与えた正常食投与群(CN)、基準食に含まれる5%のセルロースをそれぞれ豆の澱粉未消化画分と置換して与えた小豆澱粉未消化画分投与群(AS)、金時豆澱粉未消化画分投与群(KS)および手亡豆澱粉未消化画分投与群(TS)とした。それぞれの澱粉未消化画分の一般成分は表1に示す。

投与期間は4週間とし、食餌および水は自由摂取させた。毎週体重および摂食量の計測を行い、投与期間終了前3日間で糞便を採取し、-30℃で保存した。投与期間終了後ラットにネンプタール腹腔内注射によって麻酔し、肝臓および盲腸を摘出した。臓器は重量測定後液体窒素で急速冷凍し、肝臓は-80℃で保存、盲腸は-30℃で保存した。

実験2：ホッカイコガネ、ノーザンルビーおよびシャドークイーンのジャガイモ澱粉画分をフレック状に調製した。

実験動物は7週齢のFischer系雄ラット(日

本チャールス・リバー社、横浜)20匹を用い、明暗周期12時間(明期7:00~19:00)、室温 $23 \pm 1$ ℃、湿度 $60 \pm 5$ %の条件で飼育した。1週間市販の粉末飼料で馴化後、各投与群間で体重差がでないように4群に分けた。ラットの取扱いは、実験1に準じて行った。

投与群はそれぞれ、AIN-93Gを基準食として与えた正常食投与群(CN)、基準食に含まれる $\alpha$ コーンスターチの25%をそれぞれ澱粉フレックと置換して与えたホッカイコガネフレック投与群(HK)、ノーザンルビーフレック投与群(NR)およびシャドークイーンフレック投与群(SQ)とした。それぞれの澱粉未消化画分の一般成分は表2に示す。

投与期間は4週間とし、食餌および水は自由摂取させた。毎週体重および摂食量の計測を行い、投与期間終了前3日間で糞便を採取し、-30℃で保存した。投与期間終了後ラットにネンプタール腹腔内注射によって麻酔し、肝臓および盲腸を摘出した。臓器は重量測定後液体窒素で急速冷凍し、肝臓は-80℃で保存、盲腸は-30℃で保存した。

実験3：北海道十勝で栽培したチコリよりイヌリン画分(十勝イヌリン、TI)を調製し、市販

表1 Micronutrient contents in enzyme-resistant fractions of beans

(g/100g powder)	Enzyme-resistant fractions of beans		
	Adzuki	Kintoki	Tebou
Water	9.9	5.6	7.5
Protein	20.0	11.5	9.1
Lipid	0.6	1.2	1.2
Carbohydrate	66.7	78.9	79.4
Soluble fiber	11.5	20.7	17.8
Insoluble fiber	39.7	43.6	44.9
Ash	2.8	2.8	2.8

表2 Micronutrient contents in potato flakes

(g/100g powder)	Potato flakes		
	Hokkai kogane	Northern ruby	Shadow queen
Water	6.5	4.0	5.7
Protein	4.6	8.7	7.6
Lipid	0.5	0.5	0.5
Carbohydrate	83.7	81.6	80.9
Soluble fiber	2.8	2.5	2.3
Insoluble fiber	3.6	3.6	3.5
Resistant starch	1.0	0.8	1.1
Ash	3.7	4.4	4.2

されているラフティリン GR (オラフティ社、ベルギー) およびラフティリン HP (オラフティ社、ベルギー) と比較実験を行った。各イヌリンの重合度は、ラフティリン GR の平均重合度は 10 (DP10)、十勝イヌリンの平均重合度は 15 (TI15)、ラフティリン HP の平均重合度は 24 (DP24) であった (図 2)。

実験動物は 7 週齢の Fischer 系雄ラット (日本チャールス・リバー社、横浜) 25 匹を用い、明暗周期 12 時間 (明期 7:00 ~ 19:00)、室温  $23 \pm 1$  °C、湿度  $60 \pm 5$  % の条件で飼育した。1 週間市販の粉末飼料で馴化後、各投与群間で体重差がでないように 5 群に分けた。ラットの取り扱い、実験 1 に準じて行った。

投与群はそれぞれ、AIN-93G を基準食として与えた正常食投与群 (CN)、基準食に 15 % ラー

ドを添加した高脂肪食群 (CF)、高脂肪食に含まれる 5 % のセルロースを各イヌリンと置換して与えたラフティリン GR 投与群 (DP10)、十勝イヌリン投与群 (TI15) およびラフティリン HP 投与群 (DP24) とした。

投与期間は 4 週間とし、水は自由摂取とし、食餌は各群間で摂取量の差をなくすため、peer-feeding とした。毎週体重および摂食量の計測を行い、投与期間終了前 3 日間で糞便を採取し、 $-30$  °C で保存した。投与期間終了後ラットにネブタール腹腔内注射によって麻酔し、肝臓および盲腸を摘出した。臓器は重量測定後液体窒素で急速冷凍し、肝臓は  $-80$  °C で保存、盲腸は  $-30$  °C で保存した。

実験 4: 実験 3 で用いた 3 種類のイヌリンを炭

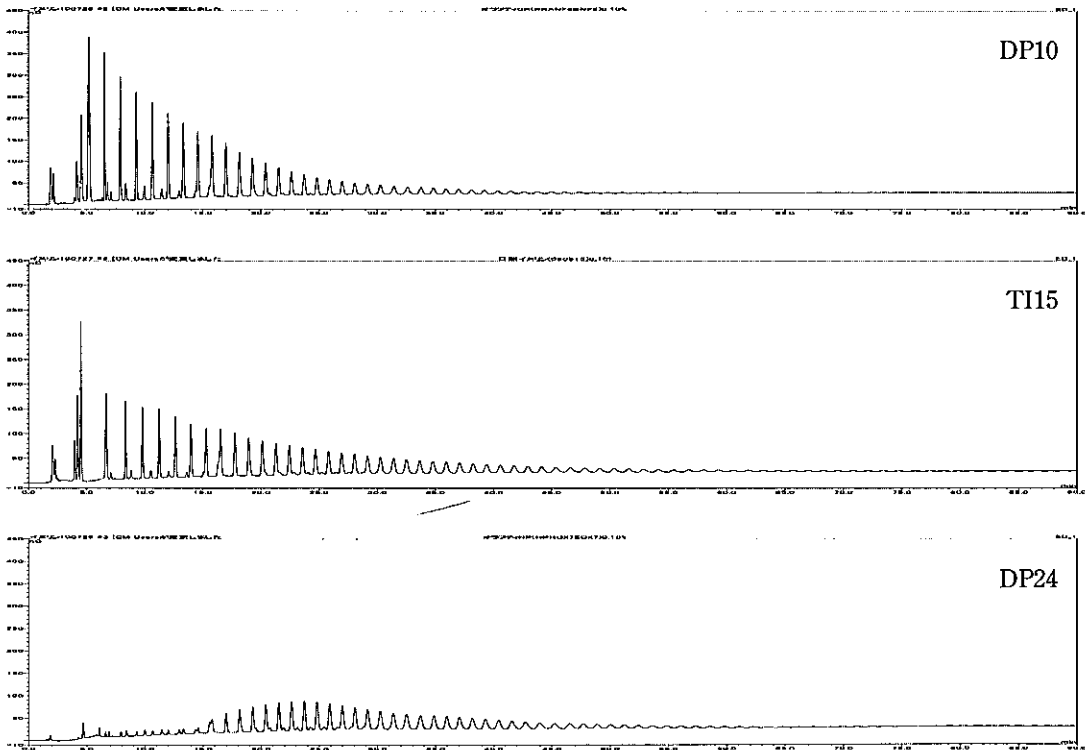


図 2 Polymerization degrees of inulin DP10, tokachi inulin TI15 and inulin DP24 (Data of Nippon Beet Sugar Manufacturing Co.,Ltd.)

素源として、ジャーファーメンターを用いて発酵試験を行った。対照区としてセルロース添加群と炭素源を加えない無添加群を用いた。腸内細菌は新鮮なブタの糞便2%菌液を Nutrient broth (Difco, Sparks, MD, USA) に混合させ、pH 5.5 に調節しながら、CO<sub>2</sub> ガス流量 0.4 ml/min、温度 37℃、液量 220 ml、培養槽内の攪拌回転数 160 rpm で、それぞれ炭素源である糖質試料を 3% 添加して 48 時間培養を行った。それぞれの培養した試料は、0 時間、24 時間、48 時間にサンプリングを行い分析に用いた。

## 2) 短鎖脂肪酸の分析

短鎖脂肪酸分析は Hara らの方法<sup>13)</sup>にしたがって盲腸内容物および微生物培養槽から採取した培養液から調製した試料を GLC に供した。ガスクロマトグラフは GC-14B (島津製作所、京都) を、カラムは ZB-FFAP キャピラリーカラム (0.53 mm × 30 m; Phenomenex, USA) を用いて、酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度を定量した。また、酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度の総和を総短鎖脂肪酸とした。

## 3) 微生物叢の分析

盲腸内の *Anaerobes* 菌、*Lactobacillus* 菌、*Bifidobacterium* 菌および *Clostridium* 菌は、Mitsuoka らの方法<sup>14)</sup> に準じてそれぞれ BL 寒天培地 (栄研化学、東京)、Rogosa 寒天培地 (Merck & Co., Inc., Germany)、TOS 寒天培地 (ヤクルト薬品、東京)、クロストリジア測定用培地 (日水製薬社、東京) を用いて GasPak より 37℃ で 5 日間培養した。大腸菌群は、EMB 培地 (栄研化学、東京) を用いて好気条件下 37℃ で 2 日間培養した。培養後、各寒天培地のコロニーをカウントすることでそれぞれの盲腸内菌数を算出した。

## 4) アンモニア窒素の分析

実験 4 の培養槽から培養液を採取し、血液検査用アンモニアキット「アンモニア-テストワコー」(和光純薬、東京) を用いて、比色法により培養液中のアンモニア窒素濃度を測定した。

## 5) 統計処理

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 の多重検定法で行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 結果および考察

### 1) 小豆、金時豆、手亡豆澱粉未消化画分のプレバイオティクス効果

豆に含まれる難消化性澱粉の効果については水煮された十勝産の小豆、およびインゲン豆の一種である金時豆、手亡豆を用いたラットへの投与試験の報告がある<sup>15,16)</sup>。この澱粉画分には小豆で 7.7%、金時豆で 16.6%、手亡豆で 23.5% のレジスタントスターチ (RS) を含有しており、生理的条件下で消化酵素ペプシン、パンクレアチンで処理を行うと、RS 含量が小豆澱粉未消化画分で 51.2%、金時豆澱粉未消化画分で 64.3%、手亡豆澱粉未消化画分で 62.7% と上昇した。

上記の澱粉未消化画分のプレバイオティクス効果について検討した結果、ラットに投与したときの盲腸内短鎖脂肪酸濃度の変化では、小豆煮豆、金時豆煮豆、手亡豆煮豆で総短鎖脂肪酸濃度が増加しており、特に酪酸濃度が有意に高い値を示していた。このことは 3 種類の煮豆によって腸内発酵、特に酪酸発酵が促進されていることが確認された<sup>15,16)</sup>。また、その澱粉未消化画分を 5% 投与した結果、煮豆を投与したときに比較して盲腸内総短鎖脂肪酸濃度が顕著に増加しており、各酢酸、プロピオン酸および酪酸濃度についても増加していた (表 3)<sup>17,18)</sup>。煮豆投与においては盲腸内で増加した酪酸濃度

と糞便中への中性ステロールの排泄量との間に正の相関 ( $r = 0.658$ ,  $p < 0.001$ ) が認められ、上記の煮豆が中性ステロール排泄量を増加させる可能性を明らかにした。

盲腸内短鎖脂肪酸濃度とステロール排泄量との関係は明らかではないが、Yajima ら<sup>19)</sup>は酪酸が結腸の運動を刺激すると報告しており、Levrat ら<sup>20)</sup>も酢酸/酪酸発酵は低コレステロール血症に効果的であることを明らかにしている。また、煮豆のレジスタントスターチが腸内発酵に起因している可能性として、煮豆の澱粉未消化画分投与の実験でも短鎖脂肪酸濃度が増加していた<sup>17, 18)</sup>。その短鎖脂肪酸濃度と糞便中への胆汁酸排泄量との間にも正の相関 ( $r = 0.744$ ,  $p < 0.01$ ) が認められている<sup>17)</sup>。Illman ら<sup>21)</sup>は短鎖脂肪酸が盲腸内中性ステロールおよび胆汁酸と正の相関関係にあると報告しており、さらに、短鎖脂肪酸が脂質生成における代謝阻害との関係についても示唆している<sup>22, 23)</sup>。レジスタントスターチの腸内発酵については多数報告があり<sup>24, 25)</sup>、今回煮豆に含まれているレジスタントスターチについても腸内発酵に顕著な影響を及ぼすことが明らかとなった。生成された短鎖脂肪酸がステロール排泄量に対しても影響を及ぼしていることも明らかとなった。

2) ホッカイコガネ、ノーザンルビーおよびシャドークイーンのジャガイモ澱粉フレークのプレバイオティクス効果

各ジャガイモフレーク投与によるラットの摂取量、体重および盲腸重量には影響はみられなかった。しかしながら、盲腸 pH では対照群に対して、すべてのジャガイモ澱粉フレークで、有意に低下していた(対照群;  $8.03 \pm 0.30^a$ 、ホッカイコガネフレーク投与群;  $7.62 \pm 0.17^b$ 、ノーザンルビーフレーク投与群;  $6.99 \pm 0.07^c$ 、シャドークイーン投与群;  $6.98 \pm 0.16^c$ ,  $p < 0.05$ )。盲腸内酢酸、酪酸および総短鎖脂肪酸濃度は各フレーク投与群とも対照区に比べ増加していたが、プロピオン酸濃度ではすべての群で差はみられなかった(表4)<sup>26)</sup>。また、総短鎖脂肪酸に対する酪酸の比率はジャガイモフレーク投与群で対照群より高く、逆に総短鎖脂肪酸に対する酢酸およびプロピオン酸の比率は対照群より低い値であった(表4)<sup>26)</sup>。盲腸内の微生物叢では、Anaerobes レベルが各ジャガイモフレーク投与群で有意に増加しており、*Lactobacillus* レベルではノーザンルビーフレーク投与群で対照区に比べ有意に増加していた。*Bifidobacterium* レベルは各投与群間で差はみられなかった(図3)。

いくつかの研究報告では、結腸粘膜での利

表3 Cecal short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in rats fed cellulose powder (CP), enzyme-resistant fraction of adzuki starch (AS), enzyme-resistant fraction of kintoki starch (KS), or enzyme-resistant fraction of tebou starch (TS) for 4 weeks<sup>a</sup>

Component	Dietary group			
	CP	AS	KS	TS
	( $\mu\text{mol/g}$ cecal content)			
Total SCFA	$26.0 \pm 8.9^a$	$116.7 \pm 32.4^b$	$126.2 \pm 45.5^b$	$99.4 \pm 44.3^b$
Acetic acid	$16.6 \pm 5.3^a$	$79.5 \pm 36.1^b$	$84.9 \pm 34.5^b$	$59.1 \pm 33.0^b$
Propionic acid	$5.3 \pm 4.9^a$	$15.0 \pm 6.9^b$	$15.2 \pm 5.9^b$	$15.4 \pm 6.0^b$
Butyric acid	$4.1 \pm 1.8^a$	$22.2 \pm 5.4^b$	$26.2 \pm 8.4^b$	$24.9 \pm 6.9^b$

<sup>a</sup>Values are expressed as means  $\pm$  SD for five rats. Means within the same rows bearing different superscript roman letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

用のためにRS、特に酪酸の発酵と盲腸内滞留時間との関係が明らかになってきている<sup>27)</sup>。Mathers & Dawson<sup>28)</sup>は、数種のジャガイモを摂取させたラットの盲腸で酪酸濃度と滞留時間との間に負の相関関係があることを報告している。さらに、Fergusonら<sup>29)</sup>は、より高濃度の酪酸は消化を刺激して、糞便重量を増加させることを報告している。ジャガイモ澱粉が酪酸の好材料あり<sup>29)</sup>、今回の実験でも、ホッカイコガ

ネフレーク、ノーザンルビーフレークおよびシャドークイーンフレークが盲腸内総短鎖脂肪酸濃度および総短鎖脂肪酸に対する酪酸の割合上昇させていることを確認できた。したがって、ジャガイモフレーク摂取による盲腸内容物および糞便重量の増加する傾向は盲腸内酪酸量の増加に伴う大腸の滞留時間の短縮によって説明されるかもしれない。

発酵産物は腸内微生物組成に影響を及ぼす。

表4 Cecal short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in rats fed control diet (CN), Hokkai kogane flake (HK), Northern ruby flake (NR), or Shadow queen flake (SQ) for 4 weeks<sup>a</sup>

Components	Dietary group			
	CN	HK	NR	SQ
Total SCFA (μmol/ g content)	53.9 ± 24.5 <sup>b</sup>	89.1 ± 17.2 <sup>a</sup>	90.7 ± 9.9 <sup>a</sup>	92.1 ± 15.7 <sup>a</sup>
Acetate	42.9 ± 21.0 <sup>b</sup>	69.3 ± 11.5 <sup>a</sup>	71.2 ± 9.8 <sup>a</sup>	72.0 ± 13.1 <sup>a</sup>
Propionate	6.7 ± 2.2 <sup>a</sup>	9.1 ± 3.0 <sup>a</sup>	8.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	8.9 ± 1.6 <sup>a</sup>
Butyrate	4.3 ± 1.8 <sup>b</sup>	10.7 ± 3.8 <sup>a</sup>	11.0 ± 3.1 <sup>a</sup>	11.2 ± 3.3 <sup>a</sup>
Molar SCFA ratio, Ac/Pr/Bu (%)	80/12/8	78/10/12	79/9/12	78/10/12

Values are expressed as means ± standard derivations for five rats. Means within the same rows bearing different superscript roman letters are significantly different (p < 0.05). Molar SCFA ratio = (acetate/total SCFA) × 100/ (propionate/total SCFA) × 100/ (butyrate/total SCFA) × 100.

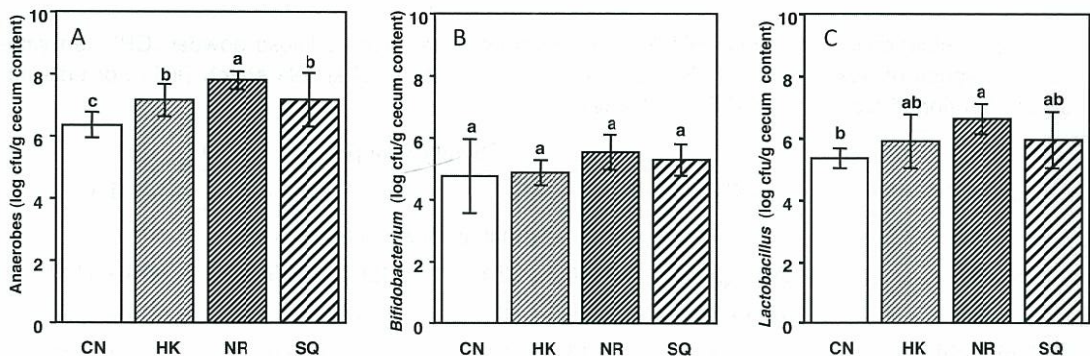


図3 Cecal anaerobes level (A), *Bifidobacterium* level (B) and *Lactobacillus* level (C) in rats fed control diet (CN), Hokkai-kogane flake (HK), Northern ruby flake (NR), or Shadow queen flake (SQ) for 4 weeks<sup>a</sup>. Values are means for five rats, with standard deviations indicated by vertical bars. A different lowercase letter above each column indicates a significant difference (p < 0.05).

最近、Dongowski ら<sup>30)</sup>は腸内発酵が高濃度の酪酸産生によって増加し、酪酸の増加によって腸内 pH を低下させることを報告している。腸内での pH の低下は、人間での結腸ガンリスクの低下に関連している<sup>31)</sup>。総短鎖脂肪酸による pH の低下は *E. coli* や *Clostridium* などの有害菌や腐敗の抑制、および *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* のような乳酸生成菌の増加を促進することによって腸内疾病の感染を抑制している<sup>32)</sup>。今回ジャガイモ澱粉フレークも同様に盲腸内の pH を低下させた。ノーザンルビーフレークは、今回特に盲腸内の Anaerobe および *Lactobacillus* レベルを対照群に対して有意に増加させていた。さらに、澱粉発酵による盲腸内

pH の低下は胆汁酸の発癌誘導を抑制することを *in vivo* および *in vitro* で報告している<sup>30, 33)</sup>。今回ジャガイモ澱粉フレークは腸内微生物叢を改善し、総短鎖脂肪酸の増加および pH の低下を促進しており、プレバイオティクス効果を有することが明らかとなった。

3) イヌリンの *in vivo* および *in vitro* におけるプレバイオティクス効果

北海道十勝で栽培したチコリよりイヌリン画分(十勝イヌリン、TI15)を調製し、市販されているラフティリン GR (オラフティ社、ベルギー、DP10) およびラフティリン HP (オラフティ社、ベルギー、DP24) と *in vivo* で peer-

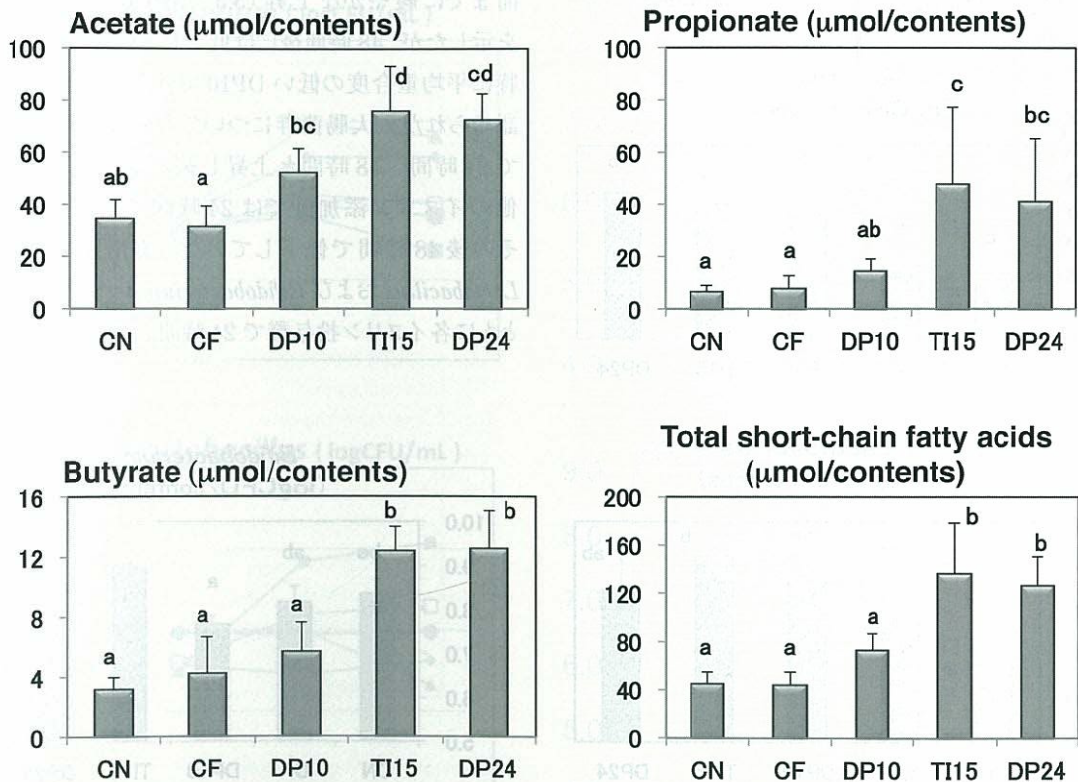


図4 Cecal short-chain fatty acid concentrations in rats fed control diet (CN), high-fat control diet (CF), DP10 diet, TI15 diet, or DP24 for 4 weeks<sup>a</sup>  
 Values are means for five rats, with standard deviations indicated by vertical bars. A different lowercase letter above each column indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ).



feeding を用いた比較実験を行った結果、体重および肝臓重量には差はみられなかった。しかしながら、盲腸重量では、正常食群と高脂肪食群間に差はみられなかったが、イヌリン投与群では増加しており、特に TI15 投与群および DP24 投与群では両対照群に対して有意に増加していた (正常食対照群;  $3.12 \pm 0.51^a$ 、高脂肪食対照群;  $3.86 \pm 0.80^a$ 、DP10 群;  $5.16 \pm 0.76^{ab}$ 、TI15 群;  $7.04 \pm 0.95^{bc}$ 、DP24 群;  $8.73 \pm 1.89^c$ 、単位: wet g/a rat)。盲腸内の短鎖脂肪酸濃度では、酢酸濃度が DP10、TI15 および DP24 投与群で CF 群に対して有意に増加しており、さらにプロピオン酸、酪酸および総短鎖脂肪酸では TI15 および DP24 投与群で CF 群に対して有意に増加していた (図 4)。盲腸内の微生物叢への影響については、Anaerobe レベル

では各イヌリン投与群で CN 群および CF 群に比べ有意に増加していた (図 5)。 *Lactobacillus* レベルでは TI15 投与群で CN 群に比べ有意に増加しており、CF 群に対しては増加する傾向が認められた。しかしながら DP10 および DP24 投与群については差がみられなかった。また、 *Bifidobacterium* レベルでも TI15 投与群で CF 群に対して有意に増加していたが、他のイヌリン投与群では CF 投与群と差は認められなかった。

ジャーファーマンターを用いた *in vitro* の試験結果では、有害菌である *Clostridium* レベルでは糖質無添加群およびセルロース群で 24 時間までに急激に増加 ( $7.0 \sim 8.0 \log\text{CFU/ml}$ ) しており、その後 48 時間では同じレベルで推移していたのに対して、各イヌリン投与群では 24 時間までに緩やかな上昇 ( $5.5 \sim 6.0 \log\text{CFU/ml}$ ) を示したが、48 時間後には低下していた (図 6)。特に平均重合度の低い DP10 では顕著な低下が認められた。大腸菌群についても糖質無添加群で 24 時間、48 時間と上昇し続けていた。その他のイヌリン添加群では 24 時間まで上昇し、その後 48 時間で低下していた。有用菌である *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* レベルでは、ともに各イヌリン投与群で 24 時間、48 時間と培

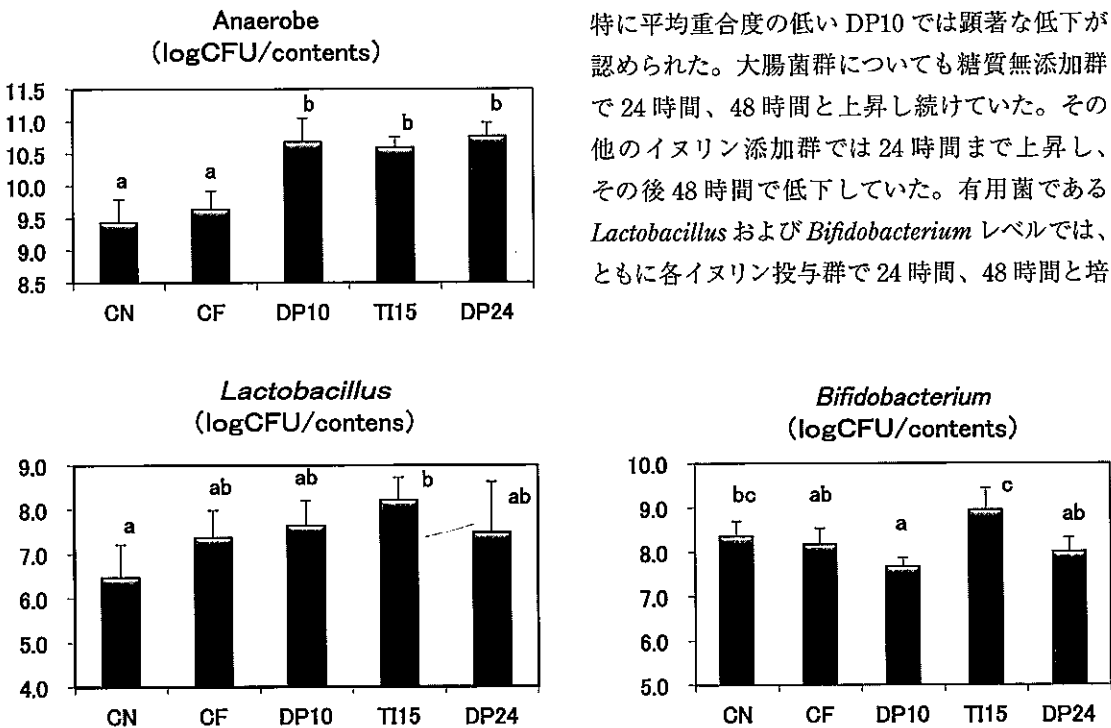


図5 Cecal flora levels in rats fed control diet (CN), high-fat control diet (CF), DP10 diet, TI15 diet, or DP24 diet for 4 weeks<sup>a</sup>

Values are means for five rats, with standard deviations indicated by vertical bars. A different lowercase letter above each column indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ).

養することによって菌数が増加していた(図6)。特にDP10投与群でその増加が顕著であった。逆に糖質無添加群およびセルロース群では培養時間に伴って菌数が低下していた。特にセルロース群の *Bifidobacterium* レベルでその低下が顕著にみられた。

腸内改善に伴って増加する短鎖脂肪酸量について図7に示す。糖質無添加群およびセルロース群に対して、各イヌリン投与群で24時間、48時間とも3~4倍増加していた。特に平均重合度の低いDP10群でその増加が顕著であった。また、腐敗物質であるアンモニア量については糖質無添加群、セルロース群で上昇しているのに対して、各イヌリン群ではその上昇を顕

著に抑制していた(図8)。

以上、イヌリンの *in vivo* および *in vitro* の結果から、今回用いたイヌリンは腸内での発酵性に優れたプロバイオティクスであることが確認された。イヌリンは非常によく研究がなされ、十分に検証がなされているプレバイオティクスである。イヌリンはヒトにおける上部消化管の加水分解に抵抗性があるため、大腸に達した際にはじめて腸内微生物のエサとなり発酵分解を受ける。この発酵によって約半分が微生物のエネルギー源として利用され、残りのほとんどが短鎖脂肪酸になる。その結果として排便重量や水分含量の増加、排便頻度の向上につながっていく<sup>34)</sup>。また、ヒト介入試験では *Lactobacillus*

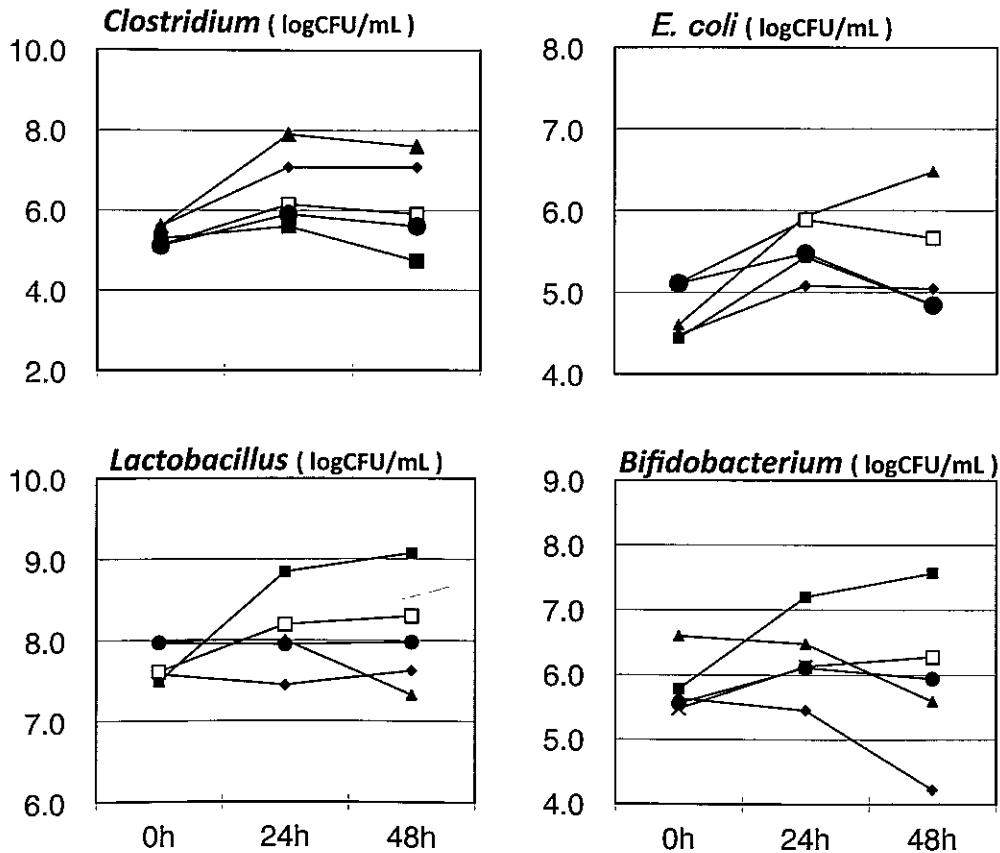


図6 Flora levels of carbohydrate-free (▲), cellulose (◆), DP10 (■), TI15 (□), or DP24 (●) in Jar-fermenter.

および *Bifidobacterium* などの有益な菌の有意な増殖により、腐敗菌あるいは病原性細菌の定着や増殖が抑えられるほか、腸内 pH の低下に基づくミネラル成分可溶化による吸収促進、ビタミンの産生、腸管機能の活性化、免疫応答の刺激もあることが多数報告されている<sup>35,36)</sup>。

今回十勝産のチコリ由来のイヌリンが、*in vivo* 試験の腸内発酵が顕著であることが明らかとなった。その理由については不明であるが、図2で示すように比較した3種類のイヌリンの平均重合度が異なっている。また、十勝イヌリンは重合度の低いタイプから重合度の高いタイプまで広範囲の分子サイズのイヌリンが混在している。この分子サイズが今回の違いに起因している可能性がある。伊藤ら<sup>37)</sup>は重合度の異なるフラクタンが、低重合度 (DP4-8) のフラクタン摂取ではラットの盲腸内の *Lactobacillus* レベルが上昇し乳酸が増加するのに対して、高重合度 (DP16-23) のフラクタンでは *Bifidobacterium* レベルの増加がみられ、短鎖脂肪酸も上昇することを報告している。さらに、*in vivo* および *in*

*vitro* 試験において発酵の違いについても認められた。*in vivo* では各イヌリンの中で、低重合度から高重合度まで広範囲に分布しているイヌリン混合物が最もプレバイオティクス効果が認められた。しかし、*in vitro* では低重合度のイヌリンほど発酵性が高くなっていった。このことは、糖質の滞留性が高い培養槽中では低分子の糖質ほど微生物の炭素源になりやすいことを示唆しているのかもしれない。以上の結果から、今回使用した十勝イヌリンには低重合度と高重合度の両方の作用効果を有しているのかもしれない。

謝 辞

本研究成果の一部は文部科学省地域イノベーションシステム整備事業の助成により行われた。

【参考文献】

- 1) Topping, D. L., Fukushima, M., Bird, A. R.: Resistant starch as a prebiotic and symbiotic: state of the art. *Proc Nutr Soc* 62: 171-176, 2003
- 2) Morita, T., Kasaoka, S., Hase, K., Kiriyama, S.: Oligo-L-methionine and resistant protein promote cecal butyrate production in rats fed resistant starch and

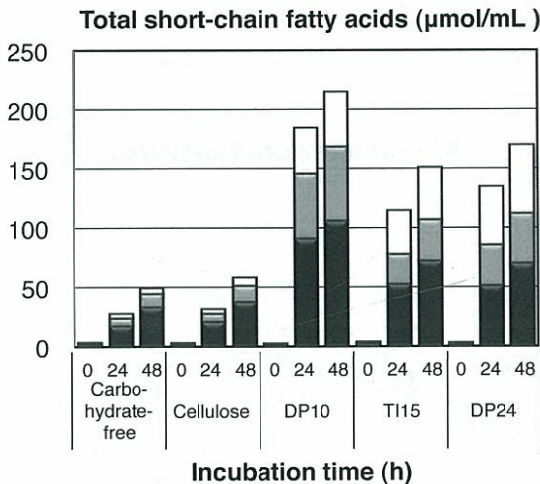


図7 Total short-chain fatty acid concentrations of carbohydrate-free, cellulose, DP10, TI15, or DP24 in Jar-fermenter. Butyrate; □, Propionate; ■, Acetate; ■.

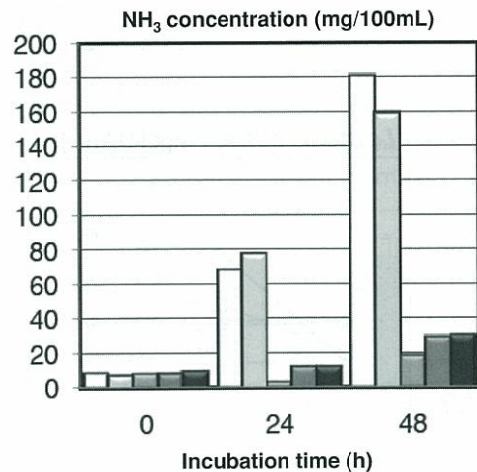


図8 NH<sub>3</sub> concentration of carbohydrate-free (□), cellulose (■), DP10 (■), TI15 (■), or DP24 (■) in Jar-fermenter.

- fructooligosaccharide. *J Nutr* 129: 1333-1339, 1999
- 3) Younes, H., Levrat, M. A., Demigné, C., Rémésy, C.: Resistant starch is more effective than cholestyramine as a lipid-lowering agent in the rat. *lipids* 30: 847-853, 1995
  - 4) Southgate, D. A. T.: Food components that behave as dietary fiber. In "CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition. 2<sup>nd</sup> ed." ed by Spiller GA, p21-22, CRC press, Tokyo, 1993
  - 5) Englyst, H. N., Hudson, G. J.: Dietary fiber and starch: Classification and measurement. In "CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition. 2<sup>nd</sup> ed." ed by Spiller GA, p53-71, CRC press, Tokyo, 1993
  - 6) Hizukuri, S., Tabata, S., Nikimi, Z.: Studies on starch phosphate: Part 1. Estimation of glucose 6-phosphate residues in starch and the presence of tuber bound phosphate (s). *Starch/Stärke* 22: 338-343, 1970
  - 7) Kamasaka, H., Uchida, M., Kusaka, K., Yoshikawa, K., Yamamoto, K., Okada, S., Ichikawa, T.: Inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharides prepared from potato starch on the formation of calcium phosphate. *Biosci Biotechnol Biochem* 8: 1412-1416, 1995
  - 8) Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A., Gibson, G. R.: The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr* 128: 11-19, 1998
  - 9) Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M., Liang, L., Gunn, S. K., Darlington, G., Ellis, K. J.: A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Nutr* 82: 471-476, 2005
  - 10) Kok, N. N., Morgan, L. M., Williams, C. M., Roberfroid, M. B., Thissen, J. P., Delzenne, N. M.: Insulin, glucagon-like peptide 1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like growth factor I as putative mediators of the hypolipidemic effect of oligofructose in rats. *J Nutr* 128: 1099-1103, 1998
  - 11) Åkerberg, A. K., Liljeberg, H. G., Granfeldt, Y. E., Drews, A. W., Björck, I. M.: An in vitro method, based on chewing, to predict resistant starch content in foods allows parallel determination of potentially available starch and dietary fiber. *J Nutr* 128: 651-660, 1998
  - 12) National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Institute of Health Publication no. 85-23, revised edn.: National Academy of Science Washington, DC, 1985
  - 13) Hara, H., Nakashima, H., Kiriya, S.: Evaluation of fermentability of acid-treated maize husk by rat cecal bacteria in vivo and in vitro. *Br J Nutr* 71: 719-729, 1994
  - 14) Mitsuoka, T., Ohno, K., Benno, Y., Suzuki, K., Namba, K.: The faecal flora of man IV. Communication: Comparison of the newly developed method with the old conventional method for the analysis of intestinal flora (article in German). *Zentralbl Bakteriol. (Orig A)* 234: 219-233, 1976
  - 15) Fukushima, M., Ohashi, T., Kojima, M., Ohba, K., Shimizu, H., Sonoyama, K., Nakano, M.: Low density lipoprotein receptor mRNA in rat liver is affected by resistant starch of beans. *Lipids* 36: 129-134, 2001
  - 16) Han, K. H., Fukushima, M., Shimizu, K., Kojima, M., Ohba, K., Tanaka, A., Shimada, K., Sekikawa, M., Nakano, M.: Resistant starches of beans reduce the serum cholesterol concentration in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 49: 281-286, 2003
  - 17) Han, K. H., Fukushima, M., Kato, T., Kojima, M., Ohba, K., Shimada, K., Sekikawa, M., Nakano, M.: Enzyme-resistant fractions of beans lowered serum cholesterol and increases sterol excretions and hepatic mRNA levels in rats. *Lipids* 38: 919-924, 2003
  - 18) Han, K. H., Sekikawa, M., Shimada, K., Sasaki, K., Ohba, K., Fukushima, M.: Resistant starch fraction prepared from kintoki bean affects gene expression of genes associated with cholesterol metabolism in rats. *Exp Biol Med* 229: 787-792, 2004
  - 19) Yajima, T.: Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J Physiol* 368: 667-678, 1985
  - 20) Levrat, M. A., Moundras, C., Younes, H., Morand, C., Demigné, C., Rémésy, C.: Effectiveness of resistant starch, compared to guar gum, in depressing plasma cholesterol and enhancing fecal steroid excretion. *Lipids* 31: 1069-1075, 1996
  - 21) Illman, R. J., Storer, G. B., Topping, D. L.: White wheat flour lowers plasma cholesterol and increases cecal steroids relative to whole wheat flour, wheat bran and wheat pollard in rats. *J Nutr* 123: 1094-1100, 1993
  - 22) Morand, C., Besson, C., Demigné, C., Rémésy, C.: Importance of the modulation of glycolysis in the control of lactate metabolism by fatty acids in isolated hepatocytes from fed rats. *Arch Biochem Biophys* 309: 254-260, 1994
  - 23) Demigné, C., Morand, C., Levrat, M. A., Besson, C., Moundras, C., Rémésy, C.: Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr* 74: 209-219, 1995
  - 24) Morita, T., Kasaoka, S., Hase, K., Kiriya, S.: Psyllium shifts the fermentation site of high-amylose cornstarch toward the distal colon and increases fecal butyrate concentration in rats. *J Nutr* 129: 2081-2087, 1999

- 1999
- 25) 奥村久美子, 中川智行, 早川享志: ラットの脂質代謝に及ぼす難消化性デンプンの摂取効果. 日本食物繊維学会誌 13 : 11-19, 2009
- 26) Han, K. H., Hayashi, N., Hashimoto, N., Shimada, K., Sekikawa, M., Noda, T., Fukushima, M.: Feeding potato flakes affects cecal short-chain fatty acids, microflora and bile acids in rats. *Ann Nutr Metab* 52: 1-7, 2008
- 27) Cummings, J. H., Macfarlane, G. T.: The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70: 443-459, 1991
- 28) Mathers, J. C., Dawson, L. D.: Large bowel fermentation in rats eating processed potatoes. *Br J Nutr* 66: 313-329, 1991
- 29) Ferguson, J. R., Tasman-Jones, C., Englyst, H., Harris, P. J.: Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. *Nutr Cancer* 36: 230-237, 2000
- 30) Dongowski, G., Jacobasch, G., Schmiedl, D.: Structural stability and prebiotic properties of resistant starch type 3 increase bile acid turnover and lower secondary bile acid formation. *J Agric Food Chem* 53: 9257-9267, 2005
- 31) Malhotra, S. L.: Caecal 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, 1982
- 32) da S. Queros-Monici, K., Costa, G. E., da Silva, N., Reis, S. M., de Oliveira, A. C.: Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition* 21: 602-608, 2005
- 33) Christl, S. U., Bartram, H. P., Ruckert, A., Scheppach, W., Kasper, H.: Influence of starch fermentation on bile acid metabolism by colonic bacteria. *Nutr Cancer* 24: 67-75, 1995
- 34) Roberfroid, M. B.: Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr* 93: S13-S25, 2005
- 35) Murphy, O.: Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *Br J Nutr* 93: S13-S25, 2005.
- 36) Guamer, F.: Role of intestinal flora in health and disease. *Br J Nutr* 97: 14-19, 2007
- 37) 伊藤弘幸, 加藤俊彦, 森田達也, 武村直紀, 園山慶, 桐山修八: フラクタン摂取の大腸生理機能に及ぼす影響は重合度により異なる. 日本食物繊維学会誌 12 : S72-S73, 2008

## Trends in functional sugar research – Focus on prebiotic effects of functional sugar –

Michihiro Fukushima, Yumi Nakamura, Seulki Lee, Hiroaki Tsuchihira, Yuka Kobayashi  
Sakura Kawakami, Tomoko Okada, Ken-ichiro Shimada and Kyu-Ho Han

Department of Food Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

### Abstract

This report describes our recent studies evaluating the prebiotic effects of indigestible sugar separated from traditionally cultivated beans and potatoes as well as newly developed chicory harvested in the Tokachi area, Hokkaido, Japan. The results indicated that the structure of starches in beans can be categorized as resistant starch type 2 (RS<sub>2</sub>). Rats were found to have reduced digestibility of beans, probably due to the conversion of RS<sub>2</sub> to resistant starch type 3 (RS<sub>3</sub>, retrograded starch) as well as interaction with denatured protein formed during the heating process. The study also found that intake of beans facilitated cecal acid-fermentation in rats, increased short chain fatty acid levels, and lowered pH. Consequently, intake of beans was found to be effective in improving the balance of intestinal flora. Potatoes contain starch composed of esterified phosphorus as well as RS<sub>2</sub>, which is likely converted to RS<sub>3</sub> during the heating process. Administration of potato starch also increased cecal short chain fatty acid levels, particularly lactic acid. The increased production of lactic acid was found to facilitate digestion, resulting in increased amounts of fecal matter. Inulin derived from chicory harvested in Tokachi area was also found to be effective in improving fecal fermentation, especially by increasing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* levels, along with increasing total short chain fatty acid concentrations. These results are in agreement with previous findings. Overall, it was found that beans and potatoes contain resistant starch with distinct properties, and that these foods, along with chicory-derived inulin demonstrated a health-promoting prebiotic effect through improvement of intestinal flora.