

トウモロコシ外皮食物繊維の
腸内環境に及ぼす影響

菅原正義

①

目 次

第 1 章

1.1 コーンファイバー含有のトウモロコシ飼料

トウモロコシ外皮食物繊維の 腸内環境に及ぼす影響

Effect of Corn Dietary Fiber on Intestinal Environment.

1.2 コーンファイバー含有のトウモロコシ飼料、

グルコサミンダーゼに及ぼす影響

1. 材料

2. 飼料配合

3. 飼料

4. 飼料

5. 飼料

6. 飼料配合

菅 原 正 義

目 次

緒 論	4
1 章 コーンファイバー投与のラット滞腸時間に 及ぼす影響	1 4
1. 序 論	1 5
2. 材料および方法	1 5
3. 結 果	1 7
4. 考 察	1 7
5. 要 約	1 8
6. 図および表	1 8
2 章 コーンファイバー投与のヒト糞便菌叢, β - グルクロニダーゼに及ぼす影響	2 2
1. 序 論	2 3
2. 材料および方法	2 4
3. 結 果	2 7
4. 考 察	2 8
5. 要 約	3 1
6. 図および表	3 2

3 章 高脂肪食およびコーンファイバー投与のヒト 糞便菌叢, 腸内細菌代謝産物に及ぼす影響	4 2
1. 序論	4 3
2. 材料および方法	4 4
3. 結果	4 8
4. 考察	4 9
5. 要約	5 3
6. 図および表	5 3
4 章 コーンファイバーから抽出した水溶性ヘミセル ロース投与のヒト糞便菌叢, 糞便酵素活性 に及ぼす影響	6 7
1. 序論	6 8
2. 材料および方法	6 9
3. 結果	7 1
4. 考察	7 2
5. 要約	7 5
6. 図および表	7 5
5 章 コーンファイバーとヘミセルロースの <i>in vitro</i> . における消化性と各種腸内細菌の資化性について	8 5
1. 序論	8 6
2. 材料および方法	8 6
3. 結果	8 8

4. 考察	8 9
5. 要約	9 2
6. 図および表	9 2
 6章 コーンファイバーからヘミセルロースを抽出した残渣投与のヒト糞便菌叢, 糞便酵素活性に及ぼす影響	 9 5
1. 序論	9 6
2. 材料および方法	9 7
3. 結果	9 9
4. 考察	1 0 0
5. 要約	1 0 2
6. 図および表	1 0 3
 総 括	 1 1 1
 謝 辞	 1 2 0
 参 考 文 献	 1 2 2
 附) 本研究に用いた培地の組成一覧	 1 3 5

食物繊維は、1972年 Trowellによって“人間の消化酵素の作用を受けない植物細胞の構造残渣”と定義されたが^(1, 2)、その後の研究によって植物の貯蔵多糖類と動物性不消化成分を前述の定義に追加して、1976年“人間の消化酵素で加水分解されない食物中の難消化成分の総体”と再定義された⁽³⁾。

20世紀において食物繊維は、必要、不要、必要とその扱われ方が大きく変化してきた。古くはHippocratesの時代から、小麦フスマは便秘の予防や治療に利用されてきたが、栄養学的にはRubnerやMcCance & Lawrenceの研究⁽⁴⁾によって各栄養素の吸収、利用を妨げる邪魔物とされた。近年、食品加工技術の発達によって高度に精製された易消化性の食品の摂取量が増加し、これにともなって非感染性の慢性疾患、いわゆる文明病、成人病が増加してきた。

1975年イギリスのTrowell^(5, 6)、Burkittらのアフリカにおける疫学的研究⁽⁷⁾によって食物繊維の重要性が再認識されて以来、多くの疫学的調査や実験動物を用いた研究が行われている。疫学的調査には、Walkerのアフリカの原住民と移住白人に関する研究⁽⁸⁾、Cleave & Campbellによるサッカリン病に関する仮説⁽⁹⁾、Malhotraによるインド南北間の疾病の差に関する研究⁽¹⁰⁾などがあり、また、Kelloggらの研究⁽¹¹⁾、Crowgill & Sullivanのフスマによる便量増大に関する研究⁽¹²⁾、Dimockのフスマの便秘、大腸炎患者に対する有効性に関する研究⁽¹³⁾、Brodrickらの食物繊維による憩室病の症状改善、予防に関する研究⁽¹⁴⁾などの便秘改善、予防に関する研究が、精力的に行われ、臨床的にも応用されている。

Ershaffは、アルファルファミール中の水不溶性画分が、飼料中のグルコアスコルビン酸の毒性を抑制することを報告し⁽¹⁵⁾、さらに重金属⁽¹⁶⁾、界面活性剤⁽¹⁷⁾、食用色素アマランス⁽¹⁸⁾、ジメチルヒドラジンのような

発ガン物質^(19, 20)などの毒性抑制に関する研究が行われ、作用機序としては食物繊維による毒性物質の吸着、空腸粘膜剥離、腸内通過時間の短縮などが考えられている。

動脈硬化症に関しては、近年、最も精力的に研究が行われている分野であり、Linらがラットにおいて⁽²¹⁾、また、Keysらがヒトにおいて⁽²²⁾、水溶性食物繊維として古くから知られているペクチンの血清コレステロール上昇抑制効果を報告して以来、多くの研究者が各種食物繊維について研究を行い、その作用機序としては、食物繊維によるコレステロールや胆汁酸の吸着、吸収阻害などが報告されている。

また、糖尿病に関しては、Jenkinsらの水溶性食物繊維であるグアガム、ペクチンが糖質の吸収に影響を与え、糖尿病の治療、予防に有効であるという報告⁽²³⁾、Andersonの低脂肪、高食物繊維食を用いた糖尿病治療例に関する報告⁽²⁴⁾などがあり、これらの作用機序は、水溶性食物繊維の粘度による吸収遅延⁽²⁵⁾が中心に考えられているが、消化管ホルモンやgastric-inhibitory polypeptide分泌抑制などからも研究⁽²⁶⁻²⁸⁾が進められている。

Burkittは、食物繊維の摂取量および精製炭水化物摂取量と大腸ガンの発生について図1のような作業仮説⁽⁶⁾を提案している。

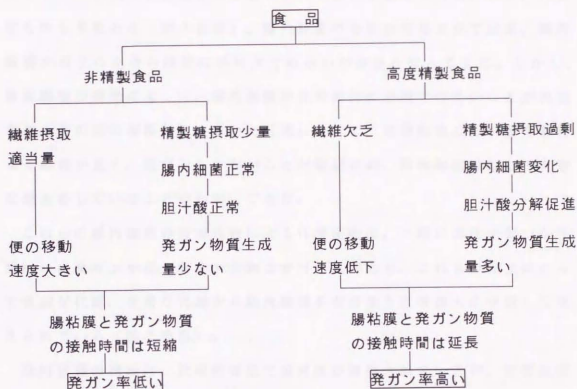


図 1 大腸ガン発生率と食事組成の関係 (Burkittによる)

食物繊維は、ヒト消化管で分解吸収されずに大腸まで達するため、大腸内に定着している腸内細菌叢に何らかの影響を与えることが考えられる。腸内細菌は、ヒト大腸内に約100種、100兆個、湿糞便1g中に約 10^{11} 個生息しており、その代謝活性は一つの臓器にも匹敵することが最近の研究によってわかってきた⁽²⁰⁾。光岡は、糞便中の菌叢を検索する方法を開発し、腸内菌叢に関する研究を精力的に続けていて、図2のような腸内細菌代謝

と宿主との関係を提唱している⁽²⁹⁾。腸内細菌は種類、数が多く、持っている酵素は多種多様であり、その活性も高い。腸内細菌の代謝活性には、ビタミンの合成や有害物質の分解などの宿主に有益なものもあるが、有害なものも多数ある（図2参照）。腸内細菌の存在が発見されて以来、腸内細菌が宿主の生命の維持に不可欠であるかが論争となってきた。しかし、無菌動物の開発によって、腸内細菌が生命維持に必須ではないことが実証され、その後の無菌動物を用いた研究によって、無菌動物の方が通常動物より寿命が長く、発ガンも少ないことが確認され、腸内細菌はむしろ有害な働きをしていることがわかってきた。

これらの腸内細菌の有害代謝による代謝産物は、一般に毒性が低いが長期的には発ガンや成人病を引き起こす可能性があり、これらの宿主にとって有益な代謝、有害な代謝から腸内細菌を有用菌と有害菌とに分類して考えられている（図3参照）。

腸内菌叢の構成は、比較的安定で恒常性が維持されているが、食事組成やストレスなどによって変動するという報告もある⁽²⁹⁻³¹⁾。食物繊維と糞便菌叢に関する研究も多数報告されているが⁽³²⁻⁴⁰⁾、特に食物繊維投与によって顕著な変動を認めたという報告は少なく、また、必ずしも一致した結果が得られていない。これは、各々の実験における糞便菌叢の検索方法、食物繊維の種類、実験の食事・飼料組成、実験期間、対象となる実験動物種・人種、年齢、性別、日常の食生活形態などの実験条件が一定でなく、また、糞便菌叢の個体差が大きいために、個体差によって変動が隠されるためかもしれない。日本人を対象とした食物繊維投与による糞便菌叢に対する影響を調べた実験では、米山らによるプルランの研究⁽⁴¹⁾、辨野らによる小麦フスマとプランタゴオバータの研究^(42,43)、遠藤らによるポリデキストロースの研究⁽⁴⁴⁾などが報告されている。

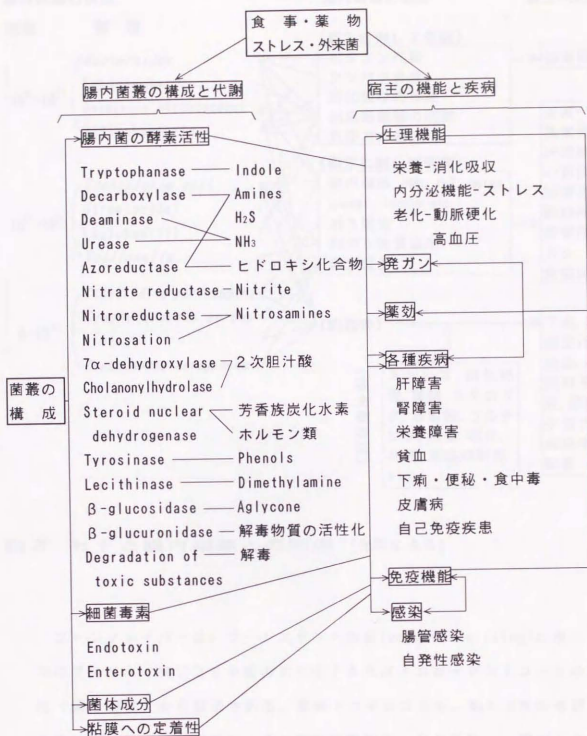


図 2 腸内菌の酵素活性と宿主 (光岡による)

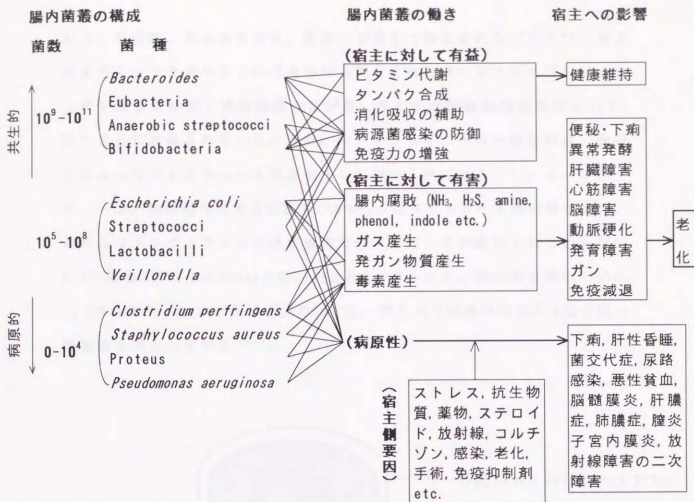


図3 ヒトと腸内細菌との関係 (光岡による)

コーンファイバーは、コーンスターチ製造(corn wet milling)に用いる主にアメリカ、南アフリカ産のホワイトまたはイエローデントコーンの外皮(図4参照)から製造される。原料トウモロコシを、約0.2%の重硫酸水中に50℃で40時間浸漬し、その間に重硫酸の一部が飛散、一部がトウモロコシ粒中に吸収され、浸漬後期には重硫酸濃度が低下して乳酸菌による乳酸発酵が起こる。浸漬後、トウモロコシを粗砕して外皮、胚乳、胚芽に分離した後、コーンファイバーは、外皮(corn hull)を機械的によく洗浄

して、亜硫酸、夾雑物を除き、乾燥、粉碎して製造される^(45, 46)。以上のように、トウモロコシの可食部から製造されたコーンファイバーは、フィチン酸含量が低く食物繊維含量が高い優れた食物繊維強化素材として、広く食品に利用されている。また、コーンファイバーの生理効果は、綾野らによってコレステロール代謝を中心に調べられている⁽⁴⁷⁾。コーンファイバーは、物理的な吸着力が強く、Storyらはタウロコール酸の吸着⁽⁴⁸⁾、竹内らはトリプトファンの変性物で強い発ガン性が確認されているTrp-P-1の吸着⁽⁴⁹⁾、Morotomiらは、Trp-P-1、グルタミン酸の変性物Glu-P-1、焼丸干しイワシの焦げ成分のMeIQ、焼牛肉の焼焦げ成分MeIQの強い吸着能を報告している⁽⁵⁰⁾。

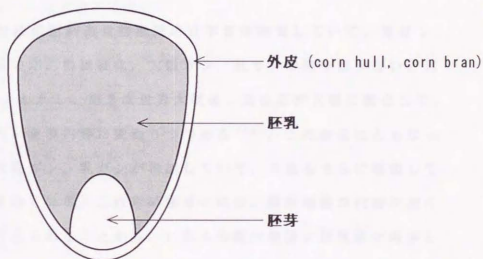


図4 コーンファイバーの原料外皮の部位

筆者もコーンファイバーと、それから希アルカリ抽出して調製したヘミセルロースをラットに投与して、コレステロールの上昇抑制効果を確認した⁽⁵¹⁾。表1に示したように、一般に水不溶性の食物繊維は、コレステロール低下効果はないか、非常に弱いと考えられている。綾野らは、消化管中でコーンファイバーから水溶性のヘミセルロース画分が溶出し、このヘミセルロースの作用によってコレステロール上昇抑制効果を示すと推論している⁽⁴⁷⁾。最近の研究で、腸内細菌叢を構成している微生物の中にコレステロールを良く吸着し、死菌体投与においてもコレステロール低下効果を示すものが見つかっている⁽⁵⁰⁾。また、コレステロール、胆汁酸が腸内細菌代謝によって2次胆汁酸やコプロスタノールに変換され、再吸収し難くなるためにコレステロール、胆汁酸の排泄が増加するという報告もある⁽⁵²⁾。

日本人は伝統的に低脂肪高食物繊維の日本食を摂食していて、胃ガン、肝ガンの発生が多いが、動脈硬化、大腸ガン、乳ガンの発生は少ないと言われてきた⁽⁵³⁾。しかし、第2次世界大戦後、食生活が大幅に変化して、急速に欧米型に近い食事内容に変わりつつある⁽⁵⁴⁾。この変化にともなって、日本人にも大腸ガン、乳ガンが増加していて、今後もさらに増加していくことが危惧されている。これらの発ガンには、腸内細菌の代謝が深く関与していると考えられることから、日本人の腸内細菌と摂取量が減少している食物繊維との関係を研究することは、大きな意義があると考えられる⁽²⁹⁾。また、食物繊維投与によって腸内菌叢や代謝の改善が可能であるならば発ガン、成人病の予防に有効であろう。

本論文では、日本人における食物繊維投与の腸内細菌叢とその代謝への影響を解明する目的で、食物繊維素材としてコーンファイバーを用いて以下の一連の実験を行った。

表 1 消化管と D F と相互作用

D F の影響	D F の種類と効力
咀嚼回数増加, 飽満感の増加	S D F, I D F
(胃における吸水, 膨潤, 飽満感の持続 過剰摂取の抑制)	S D F, I D F
(胃内滞留時間の延長, 耐糖性改善 インシュリン分泌量の節約)	S D F > I D F (?)
(コレステロールミセル化の阻害 (?) コレステロール吸収量の低下 体内コレステロール濃度の正常化)	S D F \gg I D F
胆汁酸再吸収量の低下	S D F (?), I D F
(食物塊の移動速度の変化, 消化機能の正常化 消化管ホルモンの分泌変動 (?))	S D F < I D F
毒性物質による栄養素利用障害の阻止	
(腸内細菌叢, 胆汁酸代謝, コレステロール代謝の変動 発ガン物質の産生低下 (?))	S D F, I D F
発ガン物質の結合あるいは希釈	
(コレステロール, 胆汁酸および代謝産物の排泄量の増加 排便回数の増加)	S D F < I D F
なめらかな排泄	

桐山 (化学と生物, Vol. 18, No. 2)

滯腸時間に及ぼす影響

1 序論

近年、欧米などの先進国では、食事内容の近代化によって高度に精製した食品の摂取量が増加してきている⁽⁵⁴⁾。このような食事内容の変化によって栄養学的には、脂肪摂取の増加、食物繊維摂取の不足、砂糖摂取の増加、合成食品添加物の摂取などが問題になっている。

食物繊維は、1975年にTrowell, Burkittらによってその重要性が指摘されて以来、多くの実験的、疫学的研究が行われ、便秘の予防、血清コレステロール値の改善、血糖値の上昇抑制などの生理効果が報告されている⁽²⁰⁾。しかし、その作用機序はあまり明らかになっていない。

滞腸時間は、古くから食物繊維の摂取によって短縮され、便秘の改善、予防に効果があることが広く知られている⁽⁵⁵⁾。滞腸時間の短縮は、各種栄養成分の吸収器官である小腸の物質吸収に影響を与え、大腸に到達する未消化物の量が増加する。このため、大腸内に未消化物が滞留する時間が短縮され、大腸に常在している腸内細菌叢とその代謝に影響を与えることが予想される。

本章では、トウモロコシ外皮を洗浄精製して得られた食物繊維素材コーンファイバーを、ラットに投与してその滞腸時間に及ぼす影響を調べた。

2 材料および方法

1) 供試試料

トウモロコシからコーンスターチを製造する方法である、コーンウエットミリングプロセス（湿式磨砕法）から得られたトウモロコシの外皮部分（corn hull）を、洗浄精製によって澱粉やタンパク質を除去、乾燥、粉碎して製造したコーンファイバー（セルフアー #200、日本食品化工㈱）を用いた。試料の分析値をTable 1-1に示す。コーンファイバーの粒度は、

200メッシュパスのものを用いた。一般成分は、常法⁽⁵⁶⁾によって分析を行い、食物繊維は、Van Soestらのデタージェント法^(57, 58)によって分析を行った。

2) 動物実験

試験飼料の組成をTable 1-2に示す。 α -コーンスターチを主な糖質源とした無繊維半精製飼料と、この飼料のショ糖の一部をコーンファイバーで、NDF含量5%になるように置換したコーンファイバー飼料を実験に用いた。

ウイスター系雄ラット（日本クレア㈱）は、4週令で導入して固型飼料（CE-2、日本クレア）を用いて、体重約270gになるまで自由摂食自由飲水による予備飼育を行った。ラットは、両実験群とも6匹ずつに体重をそろえて群分けを行い、4日間各々の実験食を用いて制限給餌、自由飲水によって馴化飼育を行った。すなわち、夜間（18:00～9:00）絶食させ、明朝9:00に飼料を投与することによって、昼間飼料を投与されるとすぐに飼料を食べるように馴化させた。実験当日は夜間絶食した後、酸化第2クロムを添加することによって着色した両実験飼料3gを9:00に投与した。着色飼料を投与してから90分後、着色飼料の食べ残しのないことを確認した後、無着色の両実験食を与えた。着色飼料投与後30分毎に糞便を採取して、排泄された酸化第2クロムによる着色糞便の出始めまでの時間と、出終るまでの時間を測定した。また、両実験群の糞便は、総て採取して105℃常圧乾燥によって糞便水分含量を測定した。

実験結果は、両群の平均値±標準誤差を算出し、平均値の差の検定はStudentの*t*-testによって危険率5%で有意差の検定を行った。

3 結果

Table 1-3 にコーンファイバー群と無繊維群の滯腸時間および糞便水分含量を示す。着色実験飼料を摂取してから、着色糞便の出始めるまでの時間は両群間に有意差が認められなかったが、無繊維群：17.7時間、コーンファイバー群：14.2時間であり、コーンファイバー投与によって3.5時間短縮される傾向を示した。また、出終りの時間は無繊維群：50.8時間、コーンファイバー群：32.5時間であり、コーンファイバー投与によって18.3時間の短縮がなされ、両群間に有意差($p<0.05$)が認められた。

糞便水分含量は、無繊維群：40.6%，コーンファイバー群：46.0%で、両群間に有意差($p<0.05$)が認められた。

4 考察

小麦フスマのような水不溶性の食物繊維の摂取によって、糞便重量やカサ(bulk)が増加するために滯腸時間が短縮されることは、古くから知られており、便秘の治療にも用いられている⁽⁵⁹⁾。本実験では、トウモロコシ外皮から製造された水不溶性の食物繊維素材(コーンファイバー)投与が、ラットの滯腸時間にどのような影響を及ぼすかを調べた。コーンファイバー投与によって、滯腸時間は無繊維飼料群に較べて、出始め、出終りともに短縮され、特に出終りは無繊維群の滯腸時間の65%にまで短縮した。ラットでは食物繊維を大量に投与すると、盲腸、結腸が肥大することが知られている⁽⁵⁹⁾。コーンファイバーをラットに投与した場合も、盲腸が肥大することが解剖時に確認されている。この盲腸肥大は、盲腸に到達する未消化物の増加に対する生体の適応現象と考えられるが、この現象はむしろ盲腸内での未消化成分の滞留による滯腸時間の延長をもたらすと考えられるが、実際には著しく短縮された。ヒトにおいてこのような食物成分によ

る消化管の肥大に関する報告はなく、盲腸の肥大はラットに特徴的な現象だと考えられ、ヒトにおいてはラット以上に顕著に滞腸時間を短縮することが推察される。水不溶性食物繊維のセルロースは、糞便重量を増加させるが滞腸時間は短縮されないという報告⁽⁶⁰⁾と短縮するという報告⁽⁶¹⁾があり、食物繊維投与による滞腸時間短縮がどのような機構によるものかはまだ明かではないが、腸内容物の容積の増加によって腸内時間の短縮をもたらすと考えるのが一般的である。本実験において糞便重量は測定しなかったが、コーンファイバー群のほうが明らかに糞便量が多く、また、糞便水量が多いため全体に糞塊が柔らかく容積(カサ)が大きかった。このような盲腸、大腸内容の増加や滞腸時間の短縮は、腸内環境に対して物理的な腸内容物の希釈、腸上皮への接触時間の短縮、腸内細菌による発酵、腐敗を受ける時間の短縮などの影響を与えると考えられる。

5 要約

体重約270gのウイスター系雄ラット各6匹に、 α -コーンスターチを主な糖質源とした半精製無繊維飼料と、この飼料にコーンファイバーをNDF含量5%になるように添加したコーンファイバー飼料を投与して、インジゲーターとして酸化第2クロムによる糞便の着色を用いて滞腸時間を測定した。コーンファイバー投与によって、糞便水分が増加し、滞腸時間が著しく短縮することを確認した。

6 図および表

Table 1-1 Composition of Corn Fiber

Moisture	5.9	
Crude Protein	3.8	(4.0) ^a
Crude Fat	1.0	(1.1)
Ash	0.3	(0.3)
Dietary Fiber :		
Neutral Detergent Fiber (NDF) ^b	83.2	(88.5)
Acid Detergent Fiber (ADF) ^b	21.2	(22.4)
Lignin ^b	3.0	(3.2)

^a Percentage on a dry matter basis.

^b Determined by the method of Van Soest.

Table 1-2 Composition of Test Diets

Diet	Control Diet	Corn Fiber Diet
α -Corn Starch	45	45
Casein	22	22
Lard	9	9
Corn Oil ^a	1	1
Mineral Mixture ^b	4	4
Vitamin Mixture ^b	0.85	0.85
Choline Chloride	0.15	0.15
Corn Fiber	0	6.01 ^c
Sucrose	18	11.99

^a Contained 300IU/g of Vitamin A, 30IU/g of Vitamine D₂, and 10mg/g of DL- α -tocopherol.

^b Harper's mixture.

^c Corresponded to 5% of NDF content.

Table 1-3 Effect of Corn Fiber on Transit Time and Fecal Water Content

	Control Diet (DF Free)	Corn Fiber Diet
Gastrointestinal Transit Time (hr)		
Beginning of Excretion	17.7±1.5	14.2±1.1
End of Excretion	50.8±1.2	32.5±1.2 *
Fecal Water Content (%)	40.6±1.6	46.0±0.3 *

Values are means±SD.

* Significantly different from control group ($p<0.05$).

2 章. コーンファイバー投与のヒト糞便菌叢, β -グルクロニダーゼ活性に及ぼす影響

ヒト糞便菌叢の組成は、宿主の食生活、生活環境、年齢、性別、健康状態などに大きく影響を受ける。本研究では、コーンファイバー投与によるヒト糞便菌叢の変化を調査し、 β -グルクロニダーゼ活性に及ぼす影響を明らかにする。コーンファイバーは、食物繊維の一種であり、腸内環境を整える効果がある。本研究の結果、コーンファイバー投与により、ヒト糞便菌叢の組成が変化し、 β -グルクロニダーゼ活性が増加した。これは、コーンファイバーが腸内環境を整え、有益な細菌を増殖させる効果があることを示している。本研究の結果は、コーンファイバーの健康効果について重要な示唆を与えている。今後の研究では、コーンファイバーの投与量や投与期間の影響をさらに詳しく調査する必要がある。また、コーンファイバーの成分分析や、腸内環境の変化をより詳しく調べる必要がある。本研究の結果は、コーンファイバーの健康効果について重要な示唆を与えている。今後の研究では、コーンファイバーの投与量や投与期間の影響をさらに詳しく調査する必要がある。また、コーンファイバーの成分分析や、腸内環境の変化をより詳しく調べる必要がある。

1 序 論

1 章においてコーンファイバー投与は、ラットの滞腸時間の短縮に効果があることが確認された。滞腸時間の短縮は、未消化物の大腸内における滞留時間の短縮をもたらし、大腸内の腸内細菌叢とその代謝に影響を与えることが考えられる。

腸内細菌は、ヒト消化管に約100種、100兆個生息していて、これらの微生物が持つ酵素の種類は、ヒト肝臓の酵素の種類より多いといわれている⁽²⁹⁾。近年、腸内細菌代謝の研究が進むにともない、腸内細菌代謝は単に大腸に寄生する微生物の代謝としてだけではなく、一つの臓器のような役割を果たしていると考えられるようになってきた⁽²⁹⁾。

食物繊維は、ヒトの消化酵素で消化されずに大腸に達するため、大腸に定着している腸内菌叢に影響を及ぼすことが考えられている。Ariesらは、菜食と普通食の英国人の糞便菌叢を比較した結果、Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus*が普通食よりやや低いほかは、特に差異が認められなかったと報告している⁽³⁹⁾。また、Drasarらは、高繊維食（小麦フスマ添加）の摂取によって糞便菌叢の変動が認められず⁽³⁸⁾、Bairdらは、バガス（サトウキビの搾りカス）と小麦フスマを添加したビスケットを被験者に投与しても、糞便菌叢の変動が認められなかったと報告している⁽³⁴⁾。このように食物繊維摂取による糞便菌叢の変動は、研究者、対象とする被験者、実験動物、食物繊維の種類に違いなどによって、まだ一致した結果が得られていない⁽³⁰⁾。

食物繊維摂取による腸内細菌の代謝活性の変動について、Mallettらは、小麦フスマ投与によってラットの盲腸内酵素活性が、投与量に依存して変化したと報告している⁽⁶²⁾。また、Goldinらは穀物食と肉食をラットに投与した結果、大腸ガン発生に関係すると考えられている4種類の酵素活性

に差が認められたと報告している⁽⁶³⁾。これらの腸内細菌代謝は、大腸ガンなどの成人病の発生に関して重要な働きをしているため⁽⁶⁴⁾、この腸内細菌代謝の制御は重要であると考えられる。

本章では、健康な成人男子5名の被験者にコーンファイバーをNDF量として1日5、10gを投与して、糞便性状、糞便菌叢、糞便中に排泄されたNDF量、 β -グルクロニダーゼ活性、血清脂質を測定した。

2 材料および方法

1) 被験者および実験計画

5名(25~38歳、平均30.6歳)の健康な研究所勤務で、同じメニューの和洋折衷で米を主食とした食事(摂取熱量: 2300kcal/日、総摂取熱量に占める脂肪の熱量比: 30.0%、食物繊維摂取量: 16.2g/日)を摂食している成人男子に、コーンファイバーを1日当たり6、12g投与した。各被験者は、実験開始前2カ月以内に抗生物質などの薬剤を服用していなかった。実験スケジュールをFig. 2-1に示す。まず、コーンファイバーを投与しない前対照期10日間、次に毎食後に粉末状のコーンファイバーを懸濁した飲料を投与したコーンファイバー6g期(NDF量として食物繊維5g/日に相当)を10日間、コーンファイバー12g期(NDF量として食物繊維10g/日に相当)を10日間、最後に再度コーンファイバーを投与しない後対照期10日間を行い、各実験期の毎日(4日目から10日目まで7日間)の糞便重量、糞便pHを測定、各実験期2回(7、10日目)の糞便水分含量、糞便菌叢、糞便NDF含量、 β -グルクロニダーゼ活性、血清脂質の分析を行った。なお、本実験はヘルシンキ宣言の精神に則って行った⁽⁶⁵⁾。

実験に用いたコーンファイバー(セルファー#200、日本食品化工㈱)の分析値をTable 2-1に示す。各成分の分析は、1章と同様に一般成分は

常法⁽⁵⁶⁾、食物繊維はVan Soest法^(57, 58)とProskeyらによるAOAC法⁽⁵⁹⁾によって行った。

2) 糞便菌叢の解析

糞便菌叢の解析は、光岡の方法によって行った⁽⁶⁷⁾。すなわち、各実験期7, 10日目の2回ずつ計8回、新鮮排泄便を速やかに全量ビニール袋に採取して、嫌気条件下で氷冷しながら実験室に輸送、採取後5時間以内に培養した。糞便1gを嫌気性希釈液9mLに懸濁、嫌気性希釈液を用いて嫌気的に順次10倍希釈して、 10^8 までの段階希釈を行った。

これらの段階希釈液を、非選択培地4種、選択培地10種、計14種類の寒天平板培地に塗抹して培養した。これらの培地および培養方法をTable 2-2に示し、嫌気性希釈液、寒天平板培地の組成を巻末に示す。非選択培地はEG, BL, TS, M10の4種類であり、EG, BLは一般的嫌気性菌一般の分離に用い、炭酸ガス加スチールウール嫌気ジャー法によって培養した。また、M10は高度な嫌気度を要求する嫌気性菌の分離に用いて、プレートインボトル法によって培養し、TSは好気性菌の分離に用いて、好気的に培養した。選択培地は10種類を用いて、BS, ES, NBGT, NN, VS, LBSの6種類を炭酸ガス加スチールウール嫌気ジャー法によって嫌気培養し、TATAC, DHL, PEES, Pの4種類を好気培養した。各々の寒天平板培地は、培養終了後コロニー形態とコロニー数を調べ、すべてのコロニーを鈎菌してBL寒天平板培地に接種してから、好気培養を行って好気性発育を調べた。また、同時にスライドガラス上にコロニーを火炎固定後、グラム染色標本を作成して倍率 $\times 1000$ の顕微鏡を用いて鏡検を行い、グラム染色性、菌形態、芽胞の有無を調べた。以上の実験によって、選択培地の菌数、好気性発育、グラム染色性、コロニー形態、菌形態、芽胞形成、レシチナーゼ産生などの結果から、8種の嫌気性菌と6種の好気性菌に菌群レベルで解析して、

湿糞便 1 g 当たりの各菌数を対数値で算出し、総菌数に占める各菌群の割合（占有率）を算出した。

3) 糞便 β -グルクロニダーゼ活性の測定

β -グルクロニダーゼ (β -D-glucuronide-glucuronosohydrolase EC 3.1.1.31) 活性は、Goldinらの方法⁽⁶⁸⁾を一部変更して、フェノールフタレイン- β -D-グルクロニドを基質として測定した。各実験期の 8, 10 日目の糞便菌叢の解析に用いた残りの新鮮糞便 1 g を、氷冷した 25 mM リン酸バッファー (pH 6.8) に懸濁、氷冷しながら 5 分間の超音波処理後、10000 \times g, 10 分間の遠心分離を行い上澄を活性測定に用いた。上澄を試験管に入れ、37°C の水浴中で 3 分間予備加温後、基質として 10 mM フェノールフタレイン- β -D-グルクロニド (Sigma) を添加、37°C, 30 分間加温してから 0.2 M 食塩を含む 0.2 M グリシン-NaOH バッファー (pH 10.4) を加えて、反応を停止するとともに遊離してきたフェノールフタレインを発色させた。540 nm の吸光度を測定して、遊離したフェノールフタレイン量を定量、1 時間当たりの遊離フェノールフタレインの生成量を酵素活性 (μ mol of phenolphthalein/hr/gram of wet feces) とした。

4) 糞便重量, pH, NDF 含量の測定

各実験期 4 ~ 10 日目の毎日の糞便重量は、全排泄便をビニール袋で採取して重量を測定、さらによく混合して均質にしてから、ガラス電極を直接糞塊に挿入することによって pH を測定した。糞便水分は、各実験期 7, 10 日目の糞便菌叢解析と酵素活性測定に用いた糞便の残り 10 g を、真空乾燥機 (70°C, 75 cm Hg) を用いて 3 日間乾燥して測定した。また、糞便水分測定後の乾燥糞便中の NDF 含量は、Van Soest 法^(57, 58)によって測定した。

5) 血清脂質の測定

各実験期 7, 10 日目の 2 回上腕静脈から採血を行い、血液が凝固してか

ら3000rpm, 10分間の遠心分離によって血清を分離して、総コレステロール, リン脂質, 中性脂肪を酵素法、HDL-コレステロールを沈澱法によって分離してから酵素法によって測定した。

6) 統計処理

糞便重量, pHは、各実験期の7日間のデータを平均して求め、その他の測定項目は、各実験期2回の測定データを平均した。各測定データは、平均値±標準偏差で示し、各実験期の平均値の差は、Studentの*t*-testによって危険率5%で有意差を検定した。糞便菌叢の各菌群の出現率の差は、Fisherの直接確率計算検定法によって有意差を検定した。

3 結果

1) 糞便菌叢の変動

Table 2-2に、湿糞便1g当たりの糞便菌叢を構成している各菌群の菌数を示す。また、Table 2-3に各菌群の検出率と占有率を示す。嫌気性菌の優勢菌であるBacteroidaceae, Eubacteria, Peptococcaceae, 一般にビフィズス菌と呼ばれ善玉菌の代表と考えられているBifidobacteriaの菌数, 占有率, 検出率には、コーンファイバー投与の影響が認められなかった。また、優勢菌以外のVeillonellae, Megasphaerae, 腸内腐敗菌*Clostridium perfringens*, この菌種以外の*Clostridium* (*Clostridium*-others)についても特に変動が認められなかった。

好気性菌では、Bifidobacteriaと同様に善玉とされているLactobacilli, Enterococci, Enterobacteriaceae, Staphylococci, Bacilli, Yeastにも変動が認められなかった。

2) 糞便重量, pH, NDF含量, 水分含量

Fig. 2-2に糞便重量とNDF含量の変動を示す。糞便重量は、コーンファ

イバーの投与量に依存して増加し、摂取の中止により前対照期のレベルにまで減少した。12 g 投与期では、投与前、投与後の両対照期に対して有意差が認められた($p < 0.05$)。また、糞便重量の増加にともない糞便NDF含量も増加し、特に12 g 期では56.6%に達し、両対照期に対して有意差が認められた($p < 0.05$)。

Fig. 2-3 に糞便pH、水分含量の変動を示す。糞便水分含量は、コーンファイバー摂取によって低下したが、6 g 期、12 g 期の間には差がなかった。また、糞便pHはコーンファイバー投与によって変化しなかった。

3) 糞便 β -グルクロニダーゼ活性

糞便酵素活性の変化をFig. 2-4 に示す。湿糞便1 g 当たりの β -グルクロニダーゼ活性は、コーンファイバーの添加レベルに依存して有意に減少し($p < 0.05$)、1 日当たりの総活性排泄も減少した。

4) 血清脂質

血清脂質の変化をFig. 2-5 に示す。血清脂質は、総コレステロール、リン脂質がやや低下する傾向が認められたが、有意な変化ではなかった。また、中性脂肪、HDL-コレステロールは変化しなかった。

4 考察

コーンファイバーの摂取によって糞便重量が摂取量に依存して増加した。糞便重量の増加は、水不溶性食物繊維に最も特徴的な効果と考えられている^(59, 69)。水不溶性食物繊維の糞便重量の増加は、滯腸時間を短縮させ便秘の改善をもたらす。1 章においても、コーンファイバー投与によって、ラットの滯腸時間の短縮されること確認した⁽⁷⁰⁾。滯腸時間の短縮によって、コーンファイバーやその他の未消化物が大腸内に存在する時間は短縮され、これらが腸内細菌の代謝作用を受けている時間が短縮されると考

えられる。食物繊維の摂取による糞便重量の増加の原因としては、1) 糞便水分の増加、2) 未消化栄養素(タンパク、脂肪、炭水化物)の増加、3) 食物繊維自体の排泄、4) 腸内細菌菌体成分の増加、5) 剥離腸管上皮細胞の増加などが考えられる^(6,9)。本実験において1)の原因は、コーンファイバー投与によってむしろ糞便水分含量が低下したことから、また、4)の原因は、糞便1g当たりの総菌数が変化しなかったことから、コーンファイバー投与による糞便重量増加の原因として否定される。また、2)と5)について本実験では特に検討しなかったが、今回用いた12g程度の食物繊維投与では、栄養素の消化吸収率に影響を及ぼさないという報告^(7,12)もあり、これらの因子が糞便増加の原因とは考え難い。糞便中のNDF含量がコーンファイバー投与によって糞便重量と同時に増加していることから、糞便重量の増加は、摂取したコーンファイバーがヒトの消化酵素や腸内細菌によって分解されずに排泄されたためだと考えられる。糞便中に排泄された1日当たりのNDF量は、前対照期: 9.7g, 6g期: 14.5g, 12g期: 22.4g, 後対照期: 11.0gであり、6g投与期には約4.5g増加、12g投与期に約12.5g増加したが、この排泄NDF増加量は、コーンファイバーの摂取量にほぼ一致する。また、コーンファイバー投与によって、菌群レベルでの糞便菌叢の変動は認められなかったが、これは投与されたコーンファイバーが、特定の腸内細菌によって利用されないためだと考えられる。さらに、コーンファイバー投与によって糞便pHの変動がないのも、これを示唆している。コーンファイバーが腸内細菌に分解利用されると、短鎖脂肪酸(VFA)や乳酸が糞便中に増加して糞便pHが低下すると考えられる^(7,22)。

食物繊維の腸内細菌による分解については、数多くの研究が行われていて、Williams & Olmstedは、各種繊維の消化吸収率の測定を行い、トウモロコシフスマ(corn bran)食では、リグニン、セルロース、ヘミセルロー

ス画分ともに50%程度の消化率を示したと報告している⁽⁷³⁾。しかし、Olsonらは、その構造と高分子量のためにコーンブランは、あまり分解されないと報告し⁽⁷⁴⁾、竹内らは、ラットではコーンブラン中のNDFの見かけの消化率が、20%以下であると報告している⁽⁷⁵⁾。一般に穀類の細胞壁のような水不溶性食物繊維は、腸内細菌によって分解を受け難く、細胞壁中のヘミセルロースを構成しているペントザンも比較的微生物に利用され難いとされているが、本論文で用いたコーンファイバーは、水不溶性食物繊維あり、その構成糖は60%以上がペントースである⁽⁴⁷⁾。

糞便水分含量は、一般に食物繊維摂取によって増加すると考えられている⁽⁶⁹⁾、今回の実験においては、コーンファイバー摂取によってむしろ低下した。この結果は、Bairdらによるサトウキビの搾り滓であるバガス投与の研究に一致している⁽⁸⁴⁾。1章ではコーンファイバー投与によってラットの糞便水分含量が増加したが、本実験ではヒトの糞便水分含量は変化しなかった。この結果の差異は、ラットとヒトの糞便水分の差によるものだと考えられる。すなわちラットの糞便は水分含量が少いため、コーンファイバーが糞便中に排泄された際、その高い保水性によって糞便全体の水分含量を増加させるが、ヒトの糞便は水分含量が多いため、排泄されたコーンファイバーの保水性の影響が現れ難いと考えられる。

内因、外因性の宿主に有害な物質は、肝臓でグルクロン酸抱合され、一部が胆汁中に排泄される⁽⁶⁴⁾。腸管に排泄されたグルクロン酸抱合体は、腸管からあまり吸収されないが、腸内細菌の β -グルクロニダーゼ活性によって脱抱合されると容易に再吸収されることから、有害物質は腸肝循環によって体内に長時間滞留する。このため腸内の β -グルクロニダーゼ活性の抑制は、宿主の健康の維持において有益であると考えられている⁽⁷⁶⁾。コーンファイバー投与によって、糞便1g当たりの活性が減少したと共に

1日当たりの糞排泄活性も減少したことから、この活性低下は増加した糞便による希釈によってではなく、腸内細菌による酵素生産量の減少、または酵素生産菌の減少によると考えられる。また、本実験のような菌群レベルでの菌叢解析では、コーンファイバー投与による影響が認められなかったが、菌種レベルでの菌叢が変化していることも考えられる。

血清脂質は、コーンファイバー投与によって変化しなかった。これは投与量が少なかったためか、または実験期間が短かったためかもしれない。一般に水不溶性食物繊維には、血清脂質低下効果がないか弱いと考えられていて⁽²⁰⁾、本実験での結果も、多くの水不溶性食物繊維の実験結果に一致する。

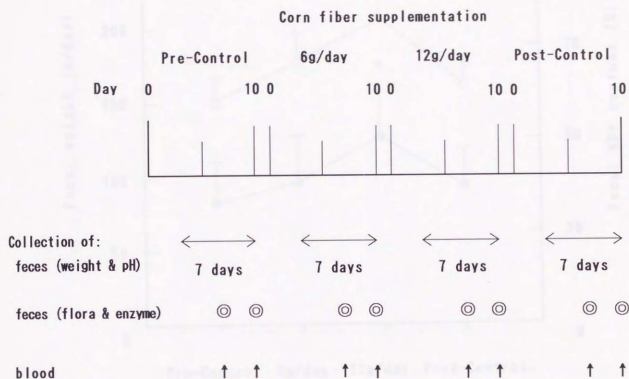
以上のように、コーンファイバーの投与によって、菌群レベルでの糞便菌叢の変化は認められなかったが、腸内細菌によって生産される β -グルクロニダーゼ活性が減少した。このように菌群レベルでは変動としては現れない菌叢変化、または腸内細菌の代謝の変動が起こっていることが示唆された。また、コーンファイバー投与によって、糞便重量と糞便NDF含量が同時に増加することから、投与されたコーンファイバーがあまり消化分解されことなく排泄されることが確認された。このようにコーンファイバーは、腸内細菌の有害代謝活性を抑制して、また、増加した糞便のカサによって基質、生成物を希釈することから、相乗的に腸内有害代謝による影響を軽減すると考えられる。

5 要約

健康な成人男子5名に、水不溶性食物繊維素材であるコーンファイバーを1日6、12g、10日間ずつ投与した結果、菌群レベルでの糞便菌叢の変化は認められなかったが、 β -グルクロニダーゼ活性が投与量に依存して

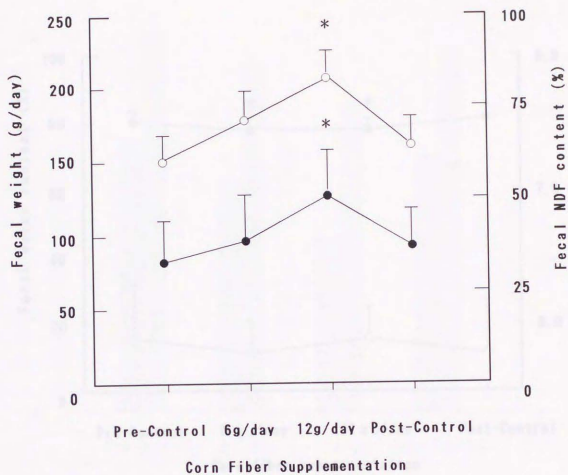
減少した。これらの結果から、コーンファイバー投与によって菌種レベルでの腸内細菌叢の変化、または酵素生産菌の代謝が変化したことが示唆された。また、コーンファイバー投与によって、糞便重量、糞便NDF含量が投与量に依存して増加したことから、投与したコーンファイバーが消化吸収されずに排泄されたと考えられる。血中脂質には、特に影響が認められなかった。

6 図および表



Subjects: n=5, Age: 25-38.

Fig. 2-1 Experimental program

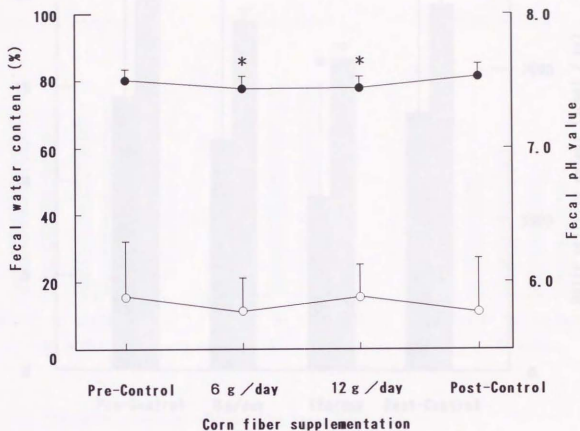


○: Fecal weight (g/day), ●: Fecal NDF content (%)

Values are means \pm SD (n=5)

* Significantly different from both control periods ($p < 0.05$)

Fig.2-2 Effect of corn fiber on fecal weight and NDF content



○: Fecal pH value, ●: Fecal water content

Values are means \pm SD (n=5)

*: Significantly different from post-control ($p < 0.05$)

Fig.2-3 Effect of corn fiber on fecal water content and pH

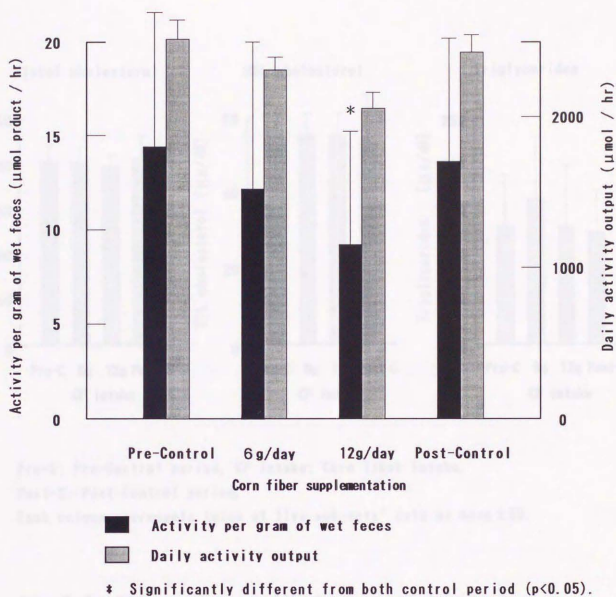
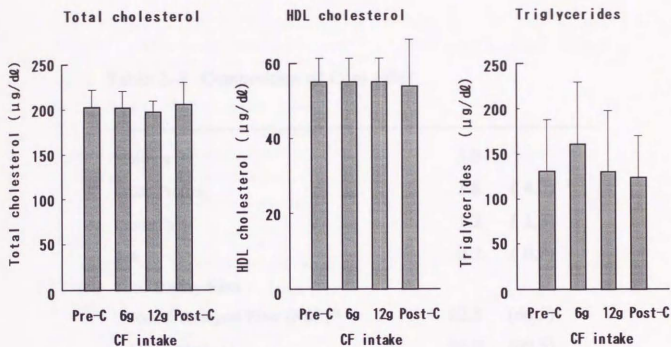


Fig.2-4 Effect of corn fiber on fecal β -glucuronidase activity



Pre-C: Pre-Control period, CF intake: Corn fiber intake,

Post-C: Post-Control period.

Each column represents twice of five subjects' data as mean \pm SD.

Fig.2-5 Effect of corn fiber on serum lipids

Table 2-1 Composition of Corn Fiber

Moisture	5.0	
Crude Protein	3.8	(4.0) ^a
Crude Fat	1.2	(1.3)
Ash	0.2	(0.3)
Total Dietary Fiber :		
Neutral Detergent Fiber (NDF) ^b	82.5	(86.5)
AOAC Method ^c	86.0	(90.5)
Cellulose ^b	21.0	(22.1)
Hemicellulose ^b	61.2	(64.4)
Lignin ^b	3.0	(3.2)

^a Percentage on a dry matter basis.

^b Determined by the method of Van Soest.

^c Determined by the method of Prosky.

Table 2-2 Culture media and methods

Medium	Main enumerated microorganisms	Dilution to be plated ^a	Incubation
Aerobic incubation (37°C) :			
TS blood agar	Predominant aerobes	10 ^{-5, -6, -7}	1 day
DHL agar	Enterobacteriaceae	10 ^{-1, -3, -5, -7}	1
TATAC agar	<i>Enterococcus</i>		2
PEES agar	<i>Staphylococcus</i>		2
P agar	Yeasts and molds		2
Anaerobic incubation (37°C) : ^b			
M10 agar	Predominant anerobes	10 ^{-7, -8}	3
EG agar	Predominant anaerobes	10 ^{-6, -7, -8}	2
BL agar	Predominant anaerobes		2
NBGT agar	Bacteroidaceae	10 ^{-1, -3, -5, -7}	2
BS agar	<i>Bifidobacterium</i>		2
ES agar	<i>Eubacterium</i>		2
VS agar	<i>Veillonella</i> , <i>Megasphaera</i>		2
LBS agar	<i>Lactobacillus</i>		2
NN agar	<i>Clostridium perfringens</i>		2

a An aliquot (0.05ml) of each dilution was plated on each medium used.

b M10 agar was prepared by using the "plate-in-bottle" method, and other media by a steelwool-jar filled with 100% CO₂ gas.

TS: trypticase soy (BBL), DHL: deoxycholate- hydrogen sulfide- lactose (EIKEN), TATAC: triphenyltetrazolium- azide- thallous sulfate- acridine orange- crystal violet, PEES: phenylethyl alcohol- egg yolk- *Staphylococcus* No10 (EIKEN), P: potato dextrose, M10: medium 10, EG: Eggerth Gagnon, BL: glucose- blood- liver (EIKEN), NBGT: neomycin- brilliant green- taurocholate- blood, BS: *Bifidobacterium* selective, ES: *Eubacterium* selective, VS: *Veillonella* selective, LBS: *Lactobacillus* selective (BBL), NN: neomycin Nagler

Table 2-3 Effect of Corn Fiber Supplementation on Human Fecal Flora

Bacterial Group	Pre-Control Period		Corn Fiber (6g/day)		Corn Fiber (12g/day)		Post-Control Period	
	Day 7	Day 10	Day 7	Day 10	Day 7	Day 10	Day 7	Day 10
Bacteroidaceae	10.5±0.1	10.5±0.1	10.5±0.2	10.4±0.2	10.5±0.2	10.5±0.1	10.4±0.2	10.5±0.2
Eubacteria	10.1±0.1	10.1±0.2	9.2±0.3	9.9±0.2	10.0±0.2	10.1±0.1	10.1±0.1	10.1±0.2
Peptococcaceae	9.8±0.1	9.9±0.2	9.8±0.2	9.7±0.2	9.9±0.4	9.7±0.2	9.8±0.2	9.9±0.4
Bifidobacteria	10.3±0.3	10.2±0.1	10.1±0.2	10.2±0.2	10.3±0.2	10.1±0.3	10.3±0.1	10.1±0.2
Veillonellae	8.1±0.1	7.0±0.6	6.4±0.6	7.9±0.5	7.8±1.7	7.5±1.4	8.3±0.9	8.2±0.9
Megasphaera	8.0±0.1	7.8	8.3±0.1	8.6	8.3±0.1	8.1±0.1	8.6	9.6±0.1
<i>Clostridium perfringens</i>	4.5±0.2	3.3±1.0	4.3	5.2±0.1	5.1±0.6	5.5±0.6	5.0±0.1	5.0±0.5
<i>Clostridium</i> - others	6.3±3.2	8.0±0.8	7.1±2.2	8.1±1.2	7.8±1.4	7.6±1.4	7.4±0.1	7.4±0.5
Lactobacilli	4.6±2.0	5.4±1.6	5.7±1.2	4.5±1.7	5.6±0.8	5.2±1.8	5.3±1.3	4.9±1.6
Enterobacteriaceae	5.7±0.5	6.7±1.1	7.3±1.3	6.8±0.9	6.6±0.7	6.9±1.1	7.0±0.7	7.3±0.7
Enterococci	6.1±1.1	6.4±0.5	6.5±0.3	5.5±1.3	7.4±0.6	6.9±0.5	6.3±1.2	6.3±0.3
Staphylococci	<2.0	2.8±0.4	3.3	2.9±0.6	3.9	3.2±0.9	3.5±0.1	2.8
Bacilli	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	7.3±0.1	<2.0	<2.0
Yeasts	4.1±0.8	3.5±1.1	3.8±1.6	5.8±0.9	3.7±0.9	3.7	4.6	3.3±0.9
Total Counts	10.9±0.1	10.8±0.1	10.8±0.1	10.8±0.2	10.8±0.1	10.8±0.1	10.8±0.1	10.9±0.1

Values are means±SD of log bacterial counts per gram of wet feces (n=8).

Table 2-4 Effect of Corn Fiber Supplementation on Human Fecal Flora Composition (%)

Bacterial Group	Pre-Control Period		Corn Fiber Supplementation Period				Post-Control Period	
			6g/day		12g/day			
Bacteroidaceae	45.4	(10/10) ^a	49.1	(10/10)	46.3	(10/10)	40.4	(10/10)
Eubacteria	18.9	(10/10)	17.5	(10/10)	20.0	(10/10)	20.4	(10/10)
Peputococcaceae	11.0	(10/10)	10.3	(10/10)	11.1	(10/10)	11.2	(10/10)
Bifidobacteria	24.9	(10/10)	24.8	(10/10)	25.2	(10/10)	22.8	(10/10)
Veillonellae	0.1	(7/10)	0.1	(7/10)	0.8	(8/10)	0.6	(6/10)
Megasphaerae	< 0.1	(1/10)	< 0.1	(2/10)	< 0.1	(2/10)	< 0.1	(2/10)
<i>Clostridium perfringens</i>	< 0.1	(5/10)	< 0.1	(2/10)	< 0.1	(5/10)	< 0.1	(4/10)
<i>Clostridium</i> – others	0.6	(8/10)	0.5	(6/10)	1.0	(10/10)	0.8	(8/10)
Lactobacilli	< 0.1	(8/10)	< 0.1	(10/10)	< 0.1	(8/10)	< 0.1	(9/10)
Enterobacteriaceae	< 0.1	(10/10)	< 0.1	(10/10)	< 0.1	(10/10)	< 0.1	(10/10)
Enterococci	< 0.1	(10/10)	< 0.1	(10/10)	< 0.1	(10/10)	< 0.1	(10/10)
Staphylococci	< 0.1	(2/10)	< 0.1	(4/10)	< 0.1	(3/10)	< 0.1	(2/10)
Bacilli	< 0.1	(0/10)	< 0.1	(0/10)	< 0.1	(1/10)	< 0.1	(0/10)
Yeasts	< 0.1	(5/10)	< 0.1	(7/10)	< 0.1	(4/10)	< 0.1	(4/10)

Values are means± of percentage of each bacterial count per total counts.

^a Frequency of occurrence.

1 序論

近年、食事組成といわれる成人病の発生に相関があることがわかってきた。欧米では、動脈硬化などの循環器疾患、大腸ガン、乳ガンなどが多く発生するが、アフリカ、アジアでは少ない⁽⁷⁷⁾。欧米の食事は、一般に高脂肪、高タンパク質、低食物繊維であり、アジア、アフリカでは、低脂肪、低タンパク質、高食物繊維である。この種の疫学的研究は多数行われ、Phillipsらによるカルフォルニア在住のSeventh-Day Adventists (SDA)と呼ばれる非常に厳格な菜食主義を続けているキリスト教の一派に関する報告⁽⁷⁸⁾、また、日本人は一般に大腸ガンの発生が少なく胃ガンの発生が多いのに対して、ハワイやカルフォルニアに移住した2世、3世の大腸ガンの発生が増加して、胃ガンの発生が低下したという報告などがある⁽⁷⁹⁾。これらの研究から、成人病発病における食事組成の重要性が明らかになり、特に脂肪、タンパク質、食物繊維の摂取量と成人病発症との相関性が注目されている。

また、これらの成人病発生率が異なる地域の住人の間における糞便菌叢の差異に関する研究も多数行われ、食事組成が異なるカナダ人と日本人において糞便菌叢が異なるという報告⁽⁸⁰⁾、長寿村として知られる山梨県棚原村の老人と、東京養育院の老人との腸内菌叢の差に関する報告⁽⁸⁰⁾、Reddyらによるノルウエーの都市と田舎の住人の腸内菌叢の差に関する研究⁽⁸¹⁾などがある。

2章でコーンファイバー投与によって、菌群レベルでの糞便菌叢の構成には変化が認められないが、 β -グルクロニダーゼ活性が減少して、糞便重量が増加することが確認された。2章の実験は、和洋折衷型の食事組成がベースとなっていて、この食事組成は栄養学的には中脂肪中食物繊維であるため食物繊維投与の影響が現れ難いことも考えられる。このため本章

では、さらに進めて日本型食事，西洋型食事，西洋型食事＋高食物繊維投与をモデル的に作出して，食事中的脂肪と食物繊維量の差による，腸内環境を反映していると考えられる各種因子の変動について検討した。

本章では，脂肪と食物繊維の摂取量が腸内環境に及ぼす影響を調べる目的で，食物繊維供給源としてコーンファイバーを用いて，8名の被験者に低脂肪低食物繊維食，高脂肪低食物繊維食，高脂肪高食物繊維食（コーンファイバー投与）を各々10日間ずつ投与して，糞便菌叢，糞便性状，糞便酵素活性，腐敗産物，血中脂質を調べた。

2 材料および方法

1) 被験者および実験計画

健康成人8名（男性6名，女性2名，26～46歳）を被験者とした。実験スケジュールをFig. 3-1に示す。まず，低脂肪低食物繊維食（総摂取熱量に占める脂肪の熱量比が14.0%，食物繊維摂取量9.0g/日，以下LFと略する）を10日間，次に高脂肪食（同52.7%，7.1g/日，以下HF）を10日間，最後に高脂肪食にコーンファイバーを1日18gを負荷した高脂肪高食物繊維食（同52.0%，24.8g/日，以下HFF）を10日間投与した。各実験期の5日間（6～10日目）の糞便を全量採取して，糞便重量，pH，変異原活性の測定に用いた。また，各実験期2回（7，10日目）の糞便について，糞便菌叢，水分含量，酵素活性（ β -グルコシダーゼ， β -グルクロニダーゼ，ニトリリダクターゼ），腐敗産物（インドール，バラクレゾール，フェノール，スカトール，ポリアミン類）を測定した。また，各実験期の7，10日目に採血を行い，血中脂質（総コレステロール，HDL-コレステロール，中性脂肪）を測定した。

なお，本研究はヘルシンキ宣言の精神に則って行った^(6,9)。

2) 供試食

各実験期における食事のエネルギー組成、栄養成分をTable 3-1に示す。各実験期において被検者の食事のメニュー内容を記録して、明治製菓㈱ニュートリションセンターにおいて摂取熱量組成、摂取食物繊維量を算定して、各食事メニューの決定を行った。HF期の脂肪負荷には、バター、ラード、クリームなどの動物脂肪を用いた。HFF期に用いたコーンファイバーは粉末、またはクッキーとして毎食後18g/日(Prosky法⁽⁶⁶⁾)で測定した食物繊維量として15.5g/日に相当)投与した。

3) 糞便菌叢の解析

糞便菌叢の解析は、*Pseudomonas aeruginosa*の選択培地であるNAC(栄研)を追加して2章と同様に光圃の方法によって行った⁽⁶⁷⁾。使用培地は、選択培地としてBS, ES, NBGT, NN, LBS, DHL, TATAC, PEES, P, NACの10種類、非選択培地としてEG, BL, TS, M10の4種類を用いた。

4) 糞便性状の測定

各実験期5日間の糞便重量を測定して、その平均を1日排泄糞便重量とした。また、pHは直接ガラス電極を挿入して測定した。各実験期7, 10日目の糞便5gを60℃, 75mmHg, 4日間の減圧乾燥法によって糞便水分を測定した。また、乾燥後の糞便を雪印乳業㈱技術研究所においてプラズマ発光分析装置を用いて糞便中のミネラル含量を測定した。

5) 糞便酵素活性、腐敗産物の測定

糞便 β -グルクロニダーゼ, β -グルコシダーゼ(β -D-glucoside glucosyl hydrolase EC 3.2.1.21), ニトリダクターゼ活性の測定は、Rowlandの方法に準拠して、糞便採取後4時間以内に行った^(82, 83)。各実験期7, 10日目の糞便菌叢を調べた残りの新鮮排泄糞便2gを、予め試験管に分注してから酸素を含まない窒素ガスを充填、4℃に予冷しておいた嫌気的

0.1Mリン酸バッファー(pH 7.0)に入れた後、再度還元銅カラムを通した酸素を含まない窒素ガスを吹き込みながらブチルゴム栓をした。よく攪拌して固形物を分散させてから4℃に保ち、この希釈液を用いて各酵素活性を測定した。なお、各酵素活性は湿糞便1g当たりの酵素活性(酵素濃度)と、1日当たりの総排泄活性(酵素生成量)を算出した。

ニトリダクターゼ活性は、37℃に予備加温した1.5mMパラニトロ安息香酸(Sigma)を含む嫌氣的0.1Mリン酸バッファー(pH 7.0)に、前述の糞便希釈液を窒素ガスを吹き込みながら嫌氣的に添加した。ブチルゴム栓をしてから37℃で加温して、15, 30, 60分後に10%トリクロル酢酸の添加によって反応を停止した。遠心分離5000rpm, 5分間によって上澄を分離して、亜硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、ナフチルエチレンジアミンを添加、ジアゾ反応によって発色させてから505nmの吸光度を測定、ニトロ安息香酸から生じたアミノ安息香酸の量を活性($\mu\text{mol of products/hr}$)とした。

β -グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ活性は、37℃に予備加温した各々3mMパラニトロフェニル- β -D-グルクロニド(Sigma), 3mMパラニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド(Sigma)を含む嫌氣的0.1Mリン酸バッファー(pH 7.0)に、ニトリダクターゼと同様に前述の糞便希釈液を嫌氣的に添加、37℃で加温して15, 30, 60分後に0.5Mグリシン-NaOHバッファー(pH 10.5)を添加して反応を停止した。遠心分離5000rpm, 5分間によって上澄を分離して405nmでの吸光度を測定、遊離したパラニトロフェノール量($\mu\text{mol of product/hr}$)を活性とした。

糞便腐敗産物の測定は、ガスクロマトグラフィーによって行い^(8.4)、糞便ポリアミン類の測定は高速液体クロマトグラフィーによって行った^(8.5)。糞便2gを水に懸濁してpHを8.5~9.0に調整した後、水蒸気蒸留を行い留分を100mLに定容、パライソプロピルフェノールを内部標準として添加し

てから、17% SE30-クロモソープW-HPカラム，FID検出器を用いたガスクロマトグラフィーで糞便腐敗産物を分析した。

また、糞便0.5gに内部標準として1,6-ジアミノヘキサンを添加、5%過塩素酸4.5mlによって2回抽出を行い、Sep-pak C18カラム(Waters)を用いて予備精製をして、ポリアミンパックカラム(東ソー)を用いて、オルトフタルアルデヒドによる反応クロマトを行い、励起340nmの蛍光を測定した。

6) 糞便中変異原活性の測定

糞便中の変異原活性は、Heddleら、Suzuki & Bruceによる大腸核異常試験法(colonic nuclear aberration assay)とAmes法によって行った⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾。大腸核異常試験は、糞便をセルロース粉末と混合してカラムに充填した後、ジクロロメタンで抽出した画分を7~8週令の雄マウス(C57BL/6J, Charles River)の直腸中に注入した。24時間後マウスを屠殺、大腸を摘出してヘマトキシリン・エオジン重染色による大腸病理標本を作成した。これを鏡検して大腸腺窩の上皮細胞に出現した異常核数(小核、核濃縮、核崩壊、核融解)を計数した。Ames試験は、糞便の20%アセトン加ジクロロメタン抽出画分を溶解したヒスチジン、ビオチン添加軟寒天、*Salmonella typhimurium* TA菌懸濁液、S-9 Mixに添加して、寒天平板培地を作成した。この培地を37℃、40時間培養して、出現するコロニー数を計数した。

7) 統計解析法

菌数については、湿糞便1g当たりに換算して常用対数で示した。他の測定項目は、各試験期2回の測定値を平均±標準偏差で示し、平均値の差はWilcoxonの符号付順位和検定法によって危険率5%で有意差の検定を行った。また、各菌群の検出率の差は、Fisherの直接確率計算検定法によ

て検定を行った。

3 結果

1) 糞便菌叢の構成

Table 3-2に各実験期2回ずつ計6回の菌群レベルでの糞便菌叢の解析結果を示す。全実験期を通して、総菌数、各菌群の菌数に有意な変化は認められなかった。LF期に対しHF期ではLactbacilliの菌数が増加し、レシチナーゼ陽性の*Clostridium* (*Clostridium perfringens*)およびEnterobacteriaceaeの菌数が減少する傾向が認められた。また、HF期に対しHFF期においては、レシチナーゼ陽性のClostridia菌数がLF期のレベルにまで減少した。

2) 糞便性状の変化

糞便pH、糞便水分含量をFig. 3-2に示す。糞便水分は全実験期を通じて変化がなかったが、糞便pHはHF期に高くなり($p<0.05$)、HFF期ではLF期のレベルにまで低下した。また、糞便重量をFig. 3-3に示す。糞便重量は、 $LF<HF<HFF$ の順に増加する傾向を示した。しかし、LF期とHF、HFF期では1日当たりの摂取熱量、摂食量が異なるため、摂取熱量1000kcal当たりの糞便重量を算出して比較すると、HF期における糞便重量の減少、HFF期における増加が認められた。また、HF期とHFF期の間には摂取カロリーに差がないのに、HFF期に糞便重量が増加した。

糞便中のミネラル含量をFig. 3-4に示す。糞便中のカルシウム、亜鉛排泄量はHF期に増加したが、HFF期にはLF期のレベルまで減少した。また、糞便中の鉄排泄量は $LF>HF>HFF$ の順に減少する傾向を示した。

3) 糞便酵素活性、腐敗産物

糞便酵素活性をFig. 3-5に示す。 β -グルコシダーゼ、 β -グルクロニ

ダーゼは、糞便 1 g 当たりの活性が LF > HF > HFF の順に低下したが、総排泄活性は HF 期に上昇して、HFF 期に低下した。また、ニトロリダクターゼは、糞便 1 g 当たりの活性、総排泄活性共に HF 期に上昇、HFF 期には低下した。

糞便中の腐敗産物を Fig. 3-6, 7 に示す。HFF 期にバラクレゾール、インドール含量が減少し、総腐敗産物量も減少した ($p < 0.05$)。糞便ポリアミン類含量を Fig. 3-8, 9 に示す。ポリアミン類の糞便中含量は、HF 投与に増加する傾向が認められたが、HFF 期にプトレッシン以外のポリアミン類の含量が減少した。

4) 糞便変異原活性

糞便変異原活性を Table 3-3 に示す。大腸核異常活性は総て正常値の範囲であったが、HF 期に上昇して HFF 期に低下する傾向が認められた。また、Ames 法の結果は、総てのサンプルにおいて陰性であった。

5) 血中脂質の変化

Fig. 3-10 に血中脂質の変化を示す。高脂肪摂取の HF, HFF 期共に、低脂肪摂取の LF 期に較べて総コレステロール、HDL-コレステロールが有意 ($p < 0.05$) に高かったが、中性脂肪については高脂肪摂取の影響が認められなかった。また、コーンファイバー摂取の影響は、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪の総てに認められなかった。

4 考察

食事組成の差が腸内菌叢の構成に及ぼす影響に関する研究は、数多くなされているが、まだ一致した成績が得られていない。しかし、疫学的研究においては、脂肪、食物繊維の摂取量と成人病の発生率には相関が認められている⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾。本実験では、日常和洋折衷型食生活をしている被験者

にLF食、HF食、HFF食を順番に投与して、糞便菌叢と腸内微生物が関与していると考えられる腐敗産物量、酵素活性、変異原物質を測定した。

Reddyらは、高タンパク質高脂肪の西洋食摂取期の後に、肉類を摂取しない低脂肪高食物繊維食を4週間摂取させた結果、*Bifidobacterium*, *Bacteroidaceae*, *Lactobacillus*の菌数が減少して、*Streptococcus*, *Staphylococcus*の菌数が増加したと報告しているが⁽³⁶⁾、食物繊維や高脂肪を負荷した実験において糞便菌叢が変動しないという報告も多数ある⁽³³⁻³⁵⁾。2章のコーンファイバー投与においても、菌群レベルでの菌叢変化は認められなかった。また、本実験でも菌群レベルでの糞便菌叢については、脂肪、コーンファイバー投与共に投与レベルの差による有意な影響は認められなかった。

菌群レベルにおける糞便菌叢が変化しなかったにもかかわらず、2章と同様にコーンファイバー投与によって糞便酵素活性が減少した。 β -グルコシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ニトリリダクターゼは、変異原物質の生成、活性化に関与すると考えられている⁽⁷⁶⁾。 β -グルコシダーゼは、植物性食品中に含まれている有害なグルコシドの毒性発現に関与している。サイカシンは、ソテツ中に含まれるグルコシドで、経口的に投与すると大腸ガンを発生させる強力な発ガン物質であるが、非経口的投与や無菌動物に経口投与した場合にガンを発生させないと報告されている⁽⁸⁹⁾。これは、サイカシンが腸内細菌の β -グルコシダーゼによってアグリコンであるメチルアゾキシメタノールが生成して、腸管から吸収されるためにガンを発生させる。このような有害植物グルコシドは、近年の研究によって多数発見されている⁽⁹⁰⁻⁹²⁾。また、 β -グルクロニダーゼは、肝臓で解毒した後胆汁中に排泄されたグルクロン酸抱合体を脱抱合する。抱合体形成は、肝臓における解毒の重要な経路であり、肝臓での抱合解毒→胆汁中への排泄

→ β -グルクロニダーゼによる脱抱合→腸管からの再吸収というような有害物質の腸肝循環が形成され、体内に滞留する時間が延長され、その生体に及ぼす悪影響が大きくなる⁽⁷⁶⁾。ニトロリダクターゼは、近年注目されているニトロソアミンなどのニトロソ化合物の生成に関与していると考えられている⁽⁷⁶⁾。

インドール、スカトール、バラクレゾール、フェノール、ポリアミン類などの腐敗産物は、腸管で細菌のアミノ酸代謝の結果生成し、これらは腸管から吸収され変異原性や発ガンのプロモーターとして働くことが知られている⁽⁹³⁾。また、ポリアミン類は、最近その生理作用が注目されているもので、細胞の増殖を促進することから大腸ガン発症との関係も注目されている⁽⁹⁴⁾。これらの宿主に有害な腸内細菌の代謝産物の生成、吸収の長期的な影響は、あまり研究がなされていないが、成人病発生の一因になることが考えられている^(29, 76)。

今回の実験でコーンファイバー投与によって、これらの腸内微生物の有害酵素活性、腐敗産物、変異原物質などの代謝物が減少したことは、宿主の健康の維持にとって有益であろう。これらの有害代謝の抑制が、腸内菌叢の菌種レベル以下の変動の結果であるか、各々の代謝活性を有する腸内細菌の代謝変化の結果であるかは明かではない。腸内pHの低下によって有害腐敗菌の増殖を抑制され、産生したVFAによって滞腸時間が短縮されることから有害代謝が行われる時間が短縮される。また、糞便の重量、カサが増加するために、酵素、基質、代謝産物が希釈されることから、さらに相乗的に有害物質の生成量、腸管からの吸収量が減少することが推察される。

食物繊維を大量に摂取するとその弊害としてミネラルの吸着による欠乏が発生することが考えられている⁽⁹⁵⁾。今回、HF期にカルシウム、鉄排泄

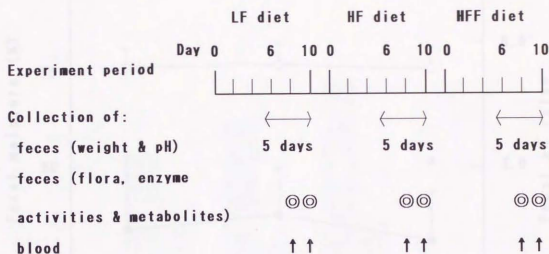
が増加したのは、脂肪負荷に用いた乳製品の増加によるカルシウム、鉄の摂取量の増加によるものであると考えられるが、コーンファイバーを投与したHFF期においては、カルシウム排泄が減少する傾向を示したことから、本実験の高食物繊維食では、むしろミネラル吸収を促進したことも考えられる。いずれにしても1日18gのコーンファイバー投与によって、特に日本人が欠乏しがちなカルシウム、亜鉛、鉄の糞便中排泄量に変化がなかったことから、この程度のコーンファイバー摂取量では、ミネラルの吸収に対して影響がないことが確認された。これはコーンファイバー中のフィチン含量が低いために、ミネラルの吸着が起こり難いことが考えられる。フィチンは、穀物の外皮、ヌカ中に多く含まれるイノシトールのリン酸塩で、キレートを形成してミネラルの吸収を阻害する⁽⁹⁶⁾。トウモロコシの外皮中にも本来フィチンが含まれているが、本論文の実験に用いたコーンファイバーは、ウエットミリング工程において亜硫酸浸漬された際にフィチンが溶出し除去されている⁽⁴⁶⁾。

以上のように低脂肪低食物繊維食、高脂肪低食物繊維食、高脂肪高食物繊維食を投与によって、脂肪投与量の差による糞便菌叢の構成、腸内細菌有害代謝産物に及ぼす顕著な影響は認められなかったが、高食物繊維の負荷によって糞便pHが低下し糞便重量が増加、腸内微生物の有害代謝産物と考えられている糞便酵素活性、腐敗産物、変異原物質が減少し、ミネラル排泄量は増加しなかった。このように、高脂肪摂取による弊害の確認をすることはできなかったが、コーンファイバー投与によって2章と同様に、大腸内容物の増加による有害代謝産物、酵素、基質の希釈や、代謝活性そのものの抑制によって相乗的に腸内菌の有害代謝による影響を軽減することが確認された。

5 要約

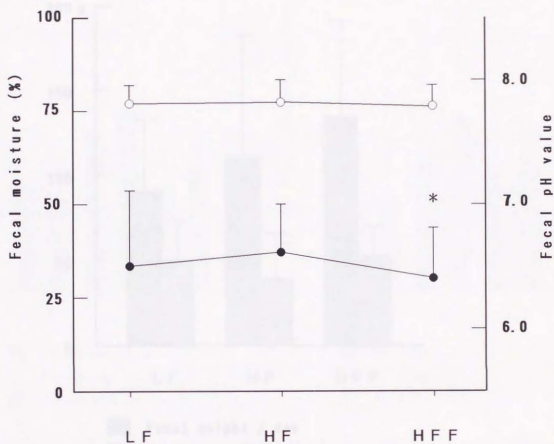
日常、和洋折衷型食事を摂取している日本人被験者8名に食物繊維源としてコーンファイバーを用いて、低脂肪低食物繊維食、高脂肪低食物繊維食、高脂肪高食物繊維食を投与した結果、脂肪投与量の差による糞便菌叢の構成、腸内細菌有害代謝産物に及ぼす顕著な影響は認められなかった。また、コーンファイバー投与によって菌群レベルでの糞便菌叢は顕著な変動を示さず、ミネラル排泄量も増加しなかったが、糞便pHが低下、糞便重量が増加した。また、腸内微生物の有害代謝産物と考えられている糞便酵素活性、腐敗産物、変異原物質が減少した。

6 図および表



LF; low fat & low dietary fiber diet, HF; high fat & low dietary fiber diet, HFF; high fat & high dietary fiber diet (18g/day of corn fiber supplementation). Subjects: n=8 (♂ 6, ♀ 2), age; 26-46.

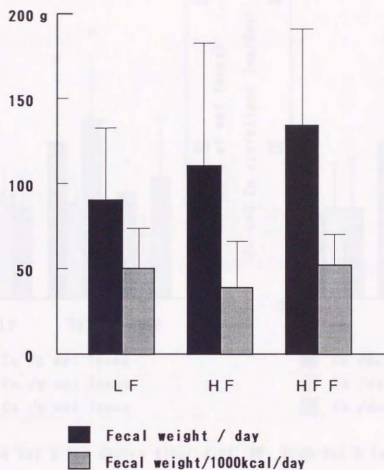
Fig. 3-1 Experimental program



●: fecal pH values, ○: fecal moisture contents

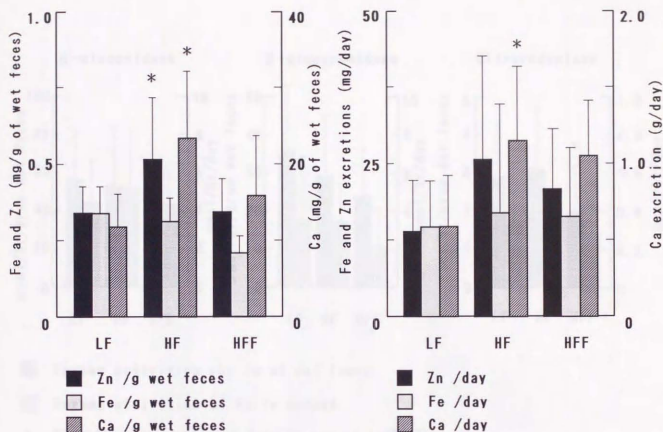
Each value represents mean \pm SD. LF: low fat & low dietary fiber diet, HF: high fat & low dietary fiber diet, HFF: high fat & high dietary fiber diet.

Fig.3-2 Effect of corn fiber and fat on fecal water and pH



Each column represents data of eight subjects for 5 days in each period as means \pm SD.

Fig. 3-3 Effect of corn fiber and fat on fecal weight

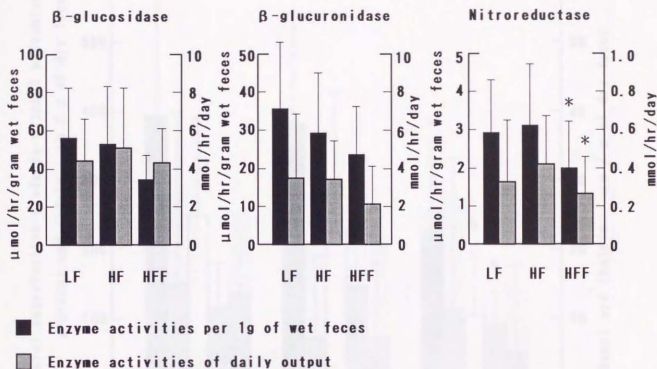


LF: low fat & low dietary fiber diet, HF: high fat & low dietary fiber diet, HFF: high fat & high dietary fiber diet.

Each column represents twice of eight subjects' data as means \pm SD.

* Significantly different from LF period ($p < 0.05$).

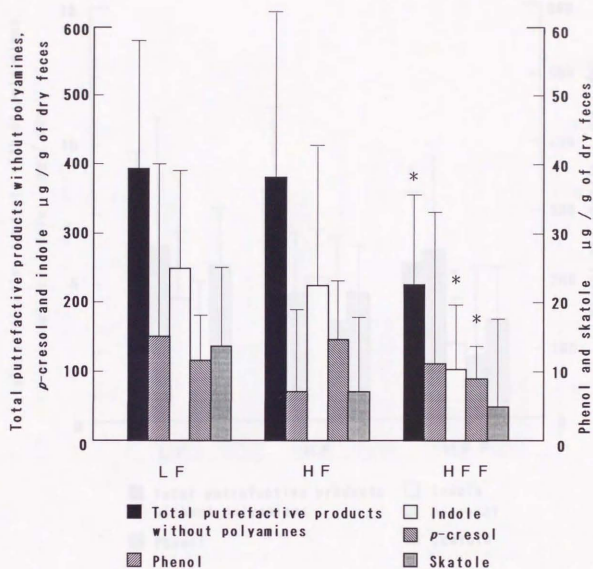
Fig. 3-4 Effect of corn fiber and fat on mineral excretions in feces



* Significantly different from HF period ($p < 0.05$).

Each column represents twice of eight subjects' data as means \pm SD.

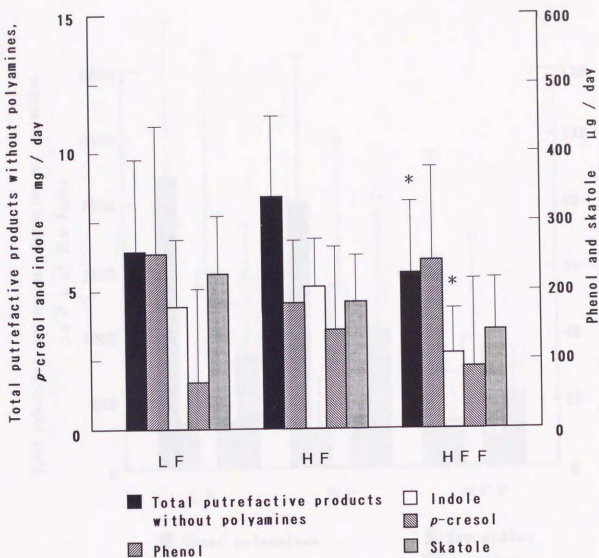
Fig.3-5 Effect of corn fiber and fat on fecal enzyme activities



Each column represents twice of 8 subjects' data as means \pm SD.

* Significantly different from HF period ($p < 0.05$)

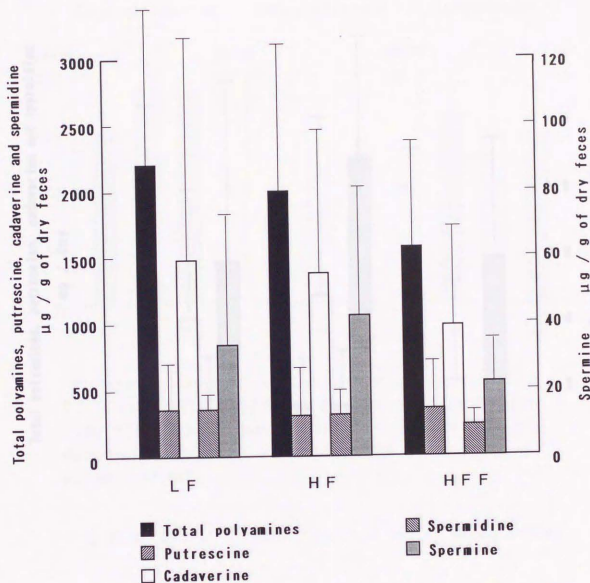
Fig. 3-6 Effect of corn fiber and fat on putrefactive product concentrations in feces



Each column represents twice of 8 subjects' data as means \pm SD.

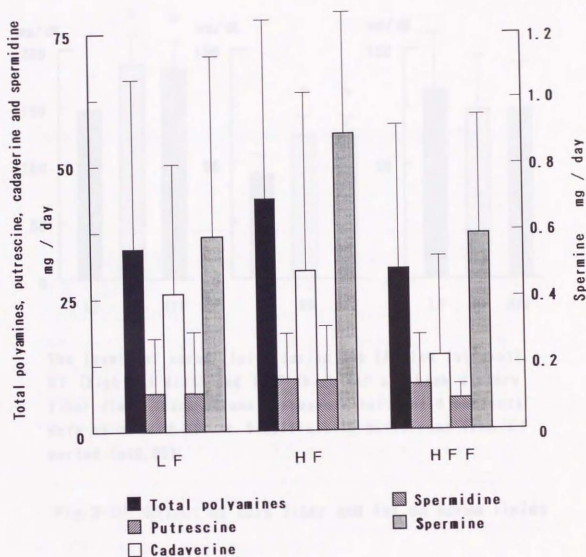
* Significantly different from HF period ($p < 0.05$)

Fig. 3-7 Effect of corn fiber and fat on putrefactive product outputs in feces



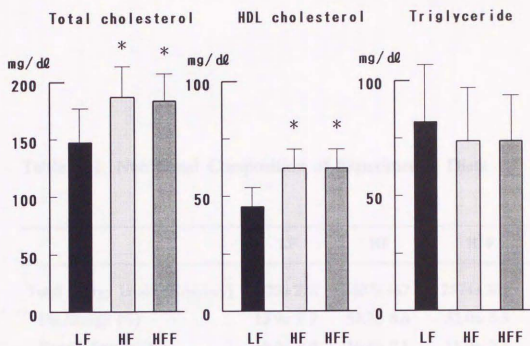
Each column represents twice of 8 subjects data as means \pm SD.

Fig. 3-8 Effect of corn fiber and fat on polyamine concentrations in feces



Each column represents twice of 8 subjects data as means \pm SD.

Fig.3-9 Effect of corn fiber and fat on polyamine outputs in feces



The levels of serum lipids during the LF (low fat diet), HF (high fat diet) and HFF (high fat and high dietary fiber diet). Each column represents twice of 8 subjects' data as mean \pm SD. * Significantly different from LF period ($p < 0.05$).

Fig.3-10 Effect of corn fiber and fat on serum lipids

Table 3-1 Nutritional Composition of Experimental Diets

	LF	HF	HFF
Total Energy Intake (Kcal/day)	1823± 278	2697± 467	2574± 301
Fat Energy (%)	13.9± 2.7	52.7± 6.8	52.0± 5.5
Protein Energy (%)	16.0± 2.0	16.4± 2.1	15.0± 2.1
Carbohydrate Energy (%)	70.0± 4.3	30.9± 7.2	33.0± 6.3
Animal Fat / Total Fat (%)	53.5± 9.5	72.3± 5.6	73.5± 6.7
Dietary Fiber Intake (g/day)	9.0± 3.2	7.1± 3.2	24.8± 7.3
Calcium Intake (mg/day)	320± 120	887± 86	802± 202
Iron Intake (mg/day)	12.2± 6.2	14.5± 8.6	14.2± 7.6

Values are means±SD.

LF: low fat and low dietary fiber diet, HF: high fat and low dietary fiber diet, and HFF: high fat and high dietary fiber diet.

Table 3-2 Effect of Corn Fiber and Fat Supplementation on Human Fecal Flora

Bacterial group	LF period		HF period		HFF period	
	Day 8	Day 10	Day 8	Day 10	Day 8	Day 10
Bacteroidaceae	10.6±0.3 (8/8)*	10.7±0.2 (8/8)	10.5±0.3 (8/8)	10.5±0.1 (8/8)	10.6±0.2 (8/8)	10.4±0.2 (8/8)
Eubacteria	10.3±0.2 (8/8)	10.2±0.3 (8/8)	10.2±0.3 (8/8)	10.4±0.3 (8/8)	10.4±0.2 (8/8)	10.1±0.3 (8/8)
Peputococcaceae	9.8±0.3 (8/8)	9.8±0.5 (8/8)	9.9±0.4 (8/8)	9.8±0.4 (8/8)	9.5±0.5 (8/8)	9.8±0.3 (7/8)
Bifidobacteria	10.0±0.3 (8/8)	10.1±0.4 (8/8)	10.3±0.3 (8/8)	10.3±0.3 (8/8)	10.2±0.3 (8/8)	10.0±0.2 (8/8)
Veillonellae	6.1±1.3 (8/8)	6.1±0.6 (8/8)	6.6±0.8 (8/8)	6.2±1.3 (8/8)	6.3±0.6 (8/8)	6.0±1.7 (7/8)
Megasphaerae	8.3 (1/8)	7.0±1.5 (4/8)	6.9±0.6 (2/8)	7.9±1.4 (4/8)	5.4 (2/8)	5.3 (2/8)
<i>Clostridium perfringens</i>	4.0 (2/8)	4.2 (2/8)	<2.0 (0/8)	<2.0 (0/8)	6.5 (2/8)	5.3 (2/8)
<i>Clostridium</i> - others	9.4±0.5 (8/8)	9.5±0.5 (8/8)	9.3±0.6 (8/8)	9.5±0.3 (8/8)	9.7±0.3 (8/8)	9.5±0.2 (8/8)
Lactobacilli	5.7±1.4 (7/8)	5.6±1.1 (7/8)	6.6±1.9 (8/8)	6.5±1.7 (8/8)	6.7±1.5 (8/8)	6.6±1.4 (8/8)
Enterobacteriaceae	7.8±1.3 (8/8)	7.5±1.3 (8/8)	6.9±0.9 (8/8)	7.3±0.9 (8/8)	6.8±1.2 (8/8)	6.6±0.8 (8/8)
Enterococci	7.0±0.9 (8/8)	6.6±0.9 (8/8)	6.5±1.3 (8/8)	6.6±1.6 (8/8)	6.9±1.4 (8/8)	7.0±1.0 (8/8)
Staphylococci	<2.0 (0/8)	<2.0 (0/8)	<2.0 (0/8)	2.6 (2/8)	2.3 (2/8)	2.8 (2/8)
Bacilli	4.2 (1/8)	<2.0 (0/8)	<2.0 (0/8)	<2.0 (0/8)	<2.0 (0/8)	<2.0 (0/8)
Yeasts	4.0±0.4 (6/8)	3.3±0.8 (7/8)	3.3±0.8 (7/8)	2.5±0.2 (3/8)	3.4±0.8 (3/8)	2.6±0.3 (4/8)
Total counts	11.0±0.1	11.0±0.2	10.9±0.1	11.0±0.2	11.0±0.1	10.8±0.2

Values are means±SD of log bacterial counts per gram of wet feces (n=8).

* Frequency of occurrence.

Table 3-3 Effect of Corn Fiber and Fat on fecal Nuclear Damage

Subject	LF	HF	HFF
1	0	6	6
2	1	1	2
3	1	1	6
4	2	5	5
5	4	11	2
6	6	7	3
7	14	10	8
Means \pm SD	4.0 \pm 4.9	5.9 \pm 3.9	4.6 \pm 2.3

Nuclear aberrations per 100 crypts.

4 章. コーンファイバーから抽出した 水溶性ヘミセルロース投与のヒ ト糞便菌叢, 糞便酵素活性に及 ぼす影響

1 序 論

これまで1章でラットのコーンファイバー投与による滞腸時間の短縮、2, 3章ではコーンファイバー投与によるヒト腸内環境に及ぼす影響を調べてきた。その結果、コーンファイバーは菌群レベルでの糞便菌叢には影響を与えないが、糞便のカサを増大させ、糞便 β -グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ニトリリダクターゼ活性を低下し、腐敗産物を減少することが確認された。

コーンファイバーは水不溶性の食物繊維であり、一般に水溶性食物繊維と水不溶性の食物繊維の生理的効果は異なると考えられている⁽²⁰⁾。水不溶性食物繊維は、糞便重量、カサの増加、滞腸時間の短縮に大きな効果を示すが、血清コレステロール値の改善などについては効果が小さく、水溶性食物繊維は、糞便重量の増加、カサの増加の効果は小さいが、血清コレステロール値の改善、糖尿病の改善については大きな効果を示す。これまでの章で確認されたコーンファイバー投与による効果の中では、糞便重量の増加については水不溶性食物繊維に特徴的な現象であるが、腸内細菌の代謝に及ぼす影響に関しては、むしろ水溶性食物繊維に特徴的な現象と考えられる。

綾野らはコーンファイバー投与によって、ラットの血清コレステロール値の上昇抑制効果を有すると報告し⁽⁴⁷⁾、その機序について消化管内で水溶性のヘミセルロースが溶出するためだと推論している。また、竹内らはラットにコーンファイバーを投与した結果、ヘミセルロースの溶出が認められたと報告している⁽⁷⁵⁾。コーンファイバーは、約60%のヘミセルロースを含み、これは酸性やアルカリ性条件下で容易に溶出される。コーンファイバーを摂取した際に、腸管内でヘミセルロースが溶出した場合、溶出したヘミセルロースが水溶性であるために、コーンファイバー本体とは異

なった生理効果を示すことが考えられる。

本章では、コーンファイバーから胃や腸管内で溶出すると考えられる水溶性ヘミセルロースの影響を調べるため、コーンファイバーから希アルカリでヘミセルロースBに相当する画分を抽出、健康な被験者に投与し腸内環境に及ぼす影響を調べた。

2 材料および方法

1) 被験者および実験計画

男7名、女2名、計9名(26~43歳、平均31.5歳)の健康で米を主食とした日本の食生活をしている被験者に、ヘミセルロース1日10gを投与した。なお、本研究はヘルシンキ宣言の精神^(6,8)に則って行った。

実験スケジュールをFig. 4-1に示す。まず、通常の食事(摂取熱量: 2400kcal/日、総摂取熱量に占める脂肪の熱量比: 27%, 食物繊維の摂取量: 18.0g/日)の前対照期を10日間、次に毎食後10g/日のヘミセルロースを含有した飲料、またはゼラチンゼリーを投与したヘミセルロース投与期を10日間、最後に再度ヘミセルロース投与を中止し通常の食事のみの後対照期10日間を行った。被験者5名について各実験期の5日間(6~10日目)の糞便を全量採取して糞便重量、pHを測定、また、被験者9名全員から各実験期2回(8, 10日目)の糞便を採取して、糞便菌叢、水分含量、酵素活性(β -グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ニトロリダクターゼ)、アンモニア含量、血清脂質を調べた。

2) ヘミセルロースの調製

ヘミセルロースは、綾野らの方法^(4,7)を一部変更してFig. 5-2に示した方法で、いわゆる“ヘミセルロースB”に相当する画分を調製した。まず、コーンファイバーを2%水酸化カルシウム水溶液に懸濁し80℃、6時

間加温した後、遠心分離3000rpm, 10分間を行い上澄を分離した。硫酸で中和、遠心分離5000rpm, 20分間により上澄を分離し、透析チューブに入れて蒸留水を用いて3日間透析を行った。透析液を0.45 μ mのメンブレンフィルター（ミリポア）を用いて濾過、凍結乾燥、粉碎した。このヘミセルロースは水溶性であり、その成分をTable 4-1に示す。一般成分は常法によって、食物繊維の分析は、Southgateらの方法によって行った⁽⁹⁷⁾。

3) 糞便菌叢の解析

糞便菌叢の解析は、2章と同様に光岡の方法によって行った⁽⁹⁷⁾。

4) 糞便性状、アンモニア含量の測定

9名の被験者中、5名について各実験期5日間（6～10日目）の排泄糞便を全量採取し、糞便重量とpHを測定した。また、9名全員の各実験期2回（8, 10日目）の排泄糞便を、2章と同様に真空乾燥法を用いて水分含量の測定を行った。

糞便アンモニア含量は、9名全員の各実験期2回（8, 10日目）の新鮮排泄糞便を採取後、すぐに2gを秤取し0℃に予冷した5%タングステン酸ナトリウムに懸濁、遠心分離3000rpm, 10分間によって除タンパク上澄を分離し、アンモニア含量測定に供した。アンモニア含量の測定は、アンモニアテストワコー（和光純薬）を用いて行った。アンモニアとフェノールからジオキシフェニルアミンを生成させた後、次亜塩素酸ナトリウムを添加し、インドフェノールを生成させ630nmの吸光度を測定した⁽⁹⁸⁾。

5) 糞便酵素活性の分析

糞便酵素活性の分析は、9名全員の各実験期2回（8, 10日目）の新鮮排泄糞便について、4章と同様にRowlandらの方法に準拠して行った

(82, 83)。

6) 血清脂質の分析

糞便重量とpHの測定に用いた被験者5名について、各実験期2回(8, 10日目)採血を行い血清を分離、3章と同様に総コレステロール、HDL-コレステロールを測定した。

7) データの統計処理

菌数については湿糞便1gあたりに換算して、常用対数で表した。他の測定項目は、各実験期2回の測定値を平均して、平均±標準偏差で示し、平均値の差は、StudentのPaired *t*-testによって危険率5%で有意差を検定した。また、腸内菌叢の各菌群の出現率の差は、Fisherの直接確率計算検定法によって有意差を検定した。

3 結果

1) 糞便菌叢

Table 4-2に糞便菌叢の変化を示す。ヘミセルロースの投与によって糞便菌叢は特に有意な変動を示さなかったが、*Bifidobacteria*の菌数が増加、*Enterobacteriaceae*の菌数が減少する傾向が認められた。

2) 糞便性状

Fig. 4-3に糞便重量の変化を示す。糞便重量はヘミセルロース投与によってやや増加する傾向を示し、投与の中止によって前対照期のレベルまで減少した。

Fig. 4-4に糞便pHと水分含量の変化を示す。糞便pHは、ヘミセルロース投与によって有意に低下し($p<0.05$)、投与の中止によって前対照期のレベルにまで増加した。糞便水分含量は、ヘミセルロースの投与によって変化しなかった。

3) 糞便アンモニア含量, 酵素活性の変化

Fig. 4-5 に、糞便アンモニア含量の変化を示す。糞便アンモニア含量は、湿糞便 1 g 当たりのアンモニア含量と 1 日当たりの総排泄量共に、ヘミセルロース投与によって有意に減少したが ($p < 0.05$)、投与中止によって前対照期のレベルにまで増加した。

Fig. 4-6 に各糞便酵素活性の変化を示す。 β -グルクロニダーゼ活性は、ヘミセルロース投与によって湿糞便 1 g 当たりの活性が有意 ($p < 0.05$) に低下し総排泄活性も低下したが、投与中止によって前対照期のレベルに戻った。また、ニトリダクターゼ活性も、ヘミセルロース投与によって湿糞便 1 g 当たりの活性が有意 ($p < 0.05$) に低下し総排泄活性も低下したが、投与中止によって前対照期のレベルにまで増加した。 β -グルコシダーゼ活性は、湿糞便 1 g 当たりの活性が低下する傾向があったが、総排泄活性は変化しなかった。

4) 血中脂質の変化

Fig. 4-7 に血中脂質の変化を示す。ヘミセルロースの投与によって特に顕著な変化は認められなかった。

4 考察

本実験では、ヘミセルロース投与によって糞便 pH が低下し、糞便重量がやや増加した。糞便 pH の低下は、投与されたヘミセルロースの一部が腸管内の腸内細菌によって分解代謝された結果、短鎖脂肪酸 (VFA) が大腸内に生成したためだと考えられる^(7, 2)。また、糞便重量が増加は、糞便水分、湿糞便 1 g 当たりの総菌数が変化していないことから、2 章のコーンファイバー投与の場合と同様に投与したヘミセルロースの一部が消化分解されずに排泄されたためだと考えられる。このように本実験で投与したヘミセ

ルロースは、一部が腸内細菌に利用され、また、一部はそのまま糞便中に排泄されたことが示唆される。

食物繊維はヒト消化管内で消化吸収されないことから、現在そのエネルギーは0 kcalとされている⁽⁹⁹⁾。しかし、腸内細菌代謝によって生じる短鎖脂肪酸が大腸から吸収され、エネルギーとして利用されることが近年の研究より明らかになってきている。直接腸管から吸収される糖質の熱量は4 kcal/gであるが⁽¹⁰⁰⁾、摂取した食物繊維が全量腸内細菌に代謝され短鎖脂肪酸としてヒトに吸収された場合、そのエネルギーがどの程度になるかが問題となっている。食物繊維の熱量を算定する試みは、多数報告されており、岡田らはプルランを2.10kcal/gと報告している⁽¹⁰¹⁾。また、大腸内で生成したVFAは、大腸上皮細胞の重要なエネルギー源になっていて、その機能に大きな影響を与え、さらに滞腸時間を短縮させると考えられている⁽¹⁰²⁾。

ヘミセルロース投与による糞便酵素活性の変化は特徴的なものであった。3章のコーンファイバー投与では、 β -グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ニトリダクターゼ活性が総て低下した。本実験におけるヘミセルロース投与では、 β -グルクロニダーゼ、ニトリダクターゼ活性は、コーンファイバー投与と同様に低下した。しかし、 β -グルコシダーゼ活性は、ヘミセルロース投与によって湿糞便1g当たりの活性が低下する傾向を示したが、1日当たりの総活性排泄は変化しなかった。この β -グルコシダーゼ活性の変化は、腸内細菌の β -グルコシダーゼ生産量が変化したためでなく、増加した糞便によって希釈されたためだと考えられる。以上のようにヘミセルロースとコーンファイバーでは、腸内細菌代謝に及ぼす影響が異なることが確認された。

近年、ヒトに消化吸収されずに腸内細菌に資化される難消化性糖質とし

て、フラクトオリゴ糖⁽¹⁰³⁾、イソマルトオリゴ糖⁽¹⁰⁴⁾、マルトテトラオース⁽¹⁰⁵⁾などのオリゴ糖が研究開発され、ビフィズス菌増殖などの生理効果を持っていることから広く利用されている。食物繊維も腸内細菌に資化されると、これらのオリゴ糖と同様な生理効果を示すことが期待されるが、ヘミセルロース投与ではオリゴ糖と同様に糞便pHの低下は認められたが、菌群レベルでの糞便菌叢の変化、特にビフィズス菌の増加は認められなかった。しかし、 β -グルクロニダーゼとニトロリダクターゼの活性が低下し、アンモニア含量が減少したのもかわらずに、 β -グルコシダーゼ活性が変化しなかったことから、これら各々の代謝活性を有する腸内細菌の代謝や菌群レベルでは検出できないさらに細かい菌種レベルでの腸内菌叢の構成に影響を及ぼしていることが示唆される。

生体内ではアミノ酸が代謝されアンモニアが生成し、尿素回路において尿素に解毒され尿中に排泄されるが、一部は胆汁と共に腸管に排泄される⁽¹⁰⁰⁾。腸管内では腸内細菌の持つウレアーゼによって、尿素は再度アンモニアに分解され再吸収される。また、腸管内ではタンパク質から腸内細菌による腸内腐敗によって、アンモニアが生成して大腸から吸収されている。このように、生体からのアンモニアの解毒排泄において腸内細菌は有害な働きをしている。実際臨床的にも、肝炎によって肝臓のアンモニア解毒能が低下した時、腸内細菌の産生するアンモニアによって血中アンモニア濃度が上昇して重篤な脳障害をおこすために、抗生物質を投与して腸内細菌を抑制する治療が行われている⁽¹⁰⁶⁾。ヘミセルロース投与による糞便中のアンモニア低下が、腸管内でのアンモニアの生成量が減少したのか、腸管からのアンモニアの吸収が亢進したかは明かではない。しかし、ヘミセルロース投与によってアンモニア吸収能が亢進するのは考え難く、ヘミセルロース投与によってアンモニア生成量が減少したと考えるのが妥当で

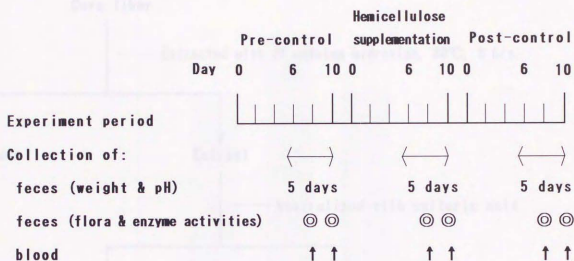
あろう。

以上のように、ヘミセルロース投与による β -グルコシダーゼ以外の酵素活性、腸内腐敗の抑制、糞便菌叢の変化は、コーンファイバー投与の場合とほぼ同一であり、コーンファイバーと同様に腸内細菌による有害代謝による影響を抑制することが確認された。

5 要約

健康な成人男子7名、女子2名にコーンファイバーから抽出した水溶性食物繊維であるヘミセルロースを1日10g、10日間投与した結果、菌群レベルの糞便菌叢の変化は認められなかったが、糞便重量が増加、pHが低下、糞便アンモニア含量、 β -グルクロニダーゼ、ニトロリダクターゼ活性が減少したが、 β -グルコシダーゼ活性は変化しなかった。また、血中脂質は、特に顕著な変動を示さなかった。

6 図および表



Subjects: n=9 (♂ 7, ♀ 2), age: 26-46.

Fig. 4-1 Experimental program

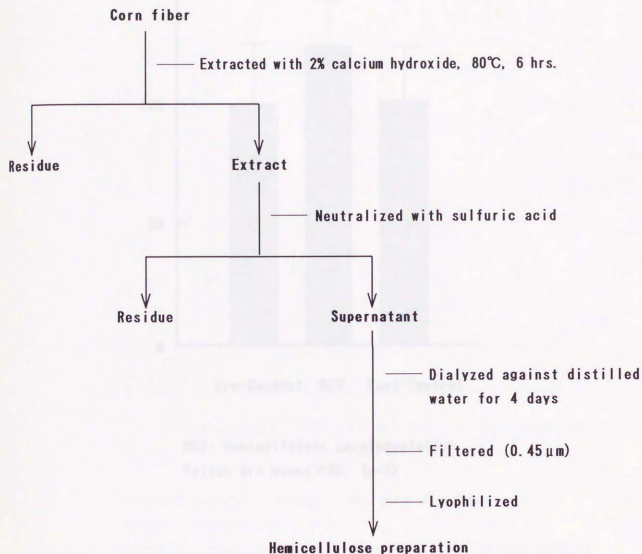
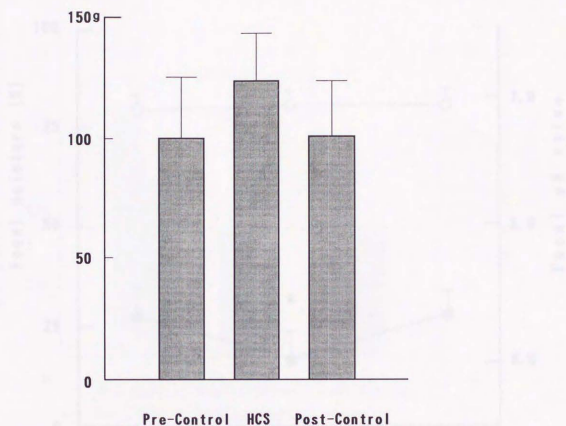


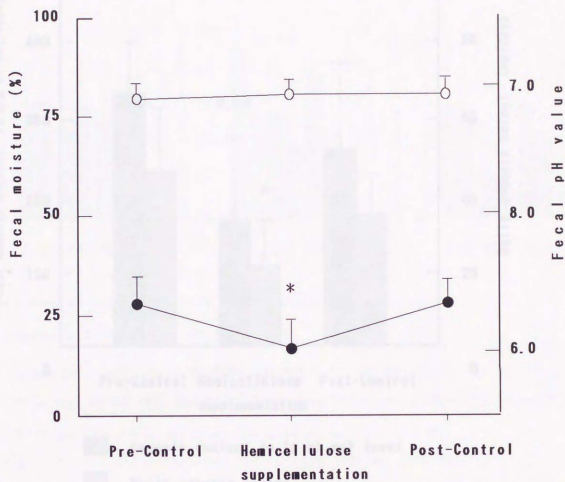
Fig. 4-2 Scheme for isolating corn hemicellulose



HCS: Hemicellulose supplementation

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

Fig. 4-3 Effect of hemicellulose on fecal weight

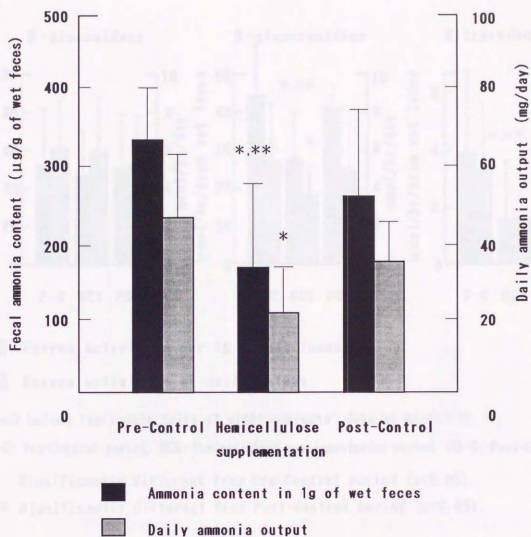


○:Fecal moisture content, ●:Fecal pH value

Values are means \pm SD (n=5)

* Significantly different from both control groups ($p < 0.05$)

Fig.4-4 Effect of hemicellulose on fecal water content and pH

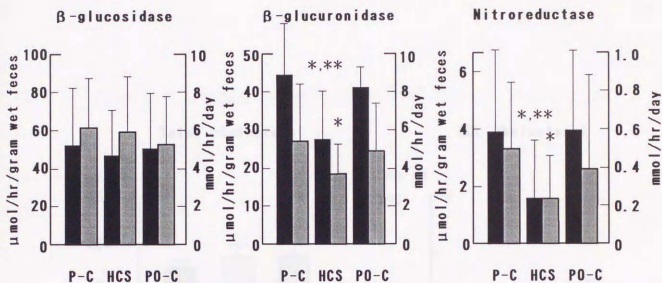


Values are mean \pm SD.

* Significantly different from Pre-Control period ($p < 0.05$).

** Significantly different from Post-Control period ($p < 0.05$).

Fig. 4-5 Effect of corn hemicellulose on fecal ammonia



■ Enzyme activities per 1g of wet feces

▨ Enzyme activities of daily output

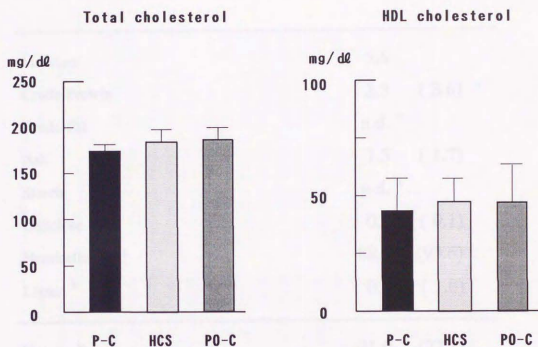
Each column represents twice of eight subjects' data as means \pm SD.

P-C: Pre-Control period, HCS: Hemicellulose supplementation period, PO-C: Post-Control period.

* Significantly different from Pre-Control period ($p < 0.05$).

** Significantly different from Post-Control period ($p < 0.05$).

Fig. 4-6 Effect of corn hemicellulose on fecal enzyme activities



Each column represents twice of 5 subjects' data as mean \pm S. D. P-C: Pre-control period, HCS: Hemicellulose supplementation period, PO-C: Post-control period.

Fig. 4-7 Effect of corn hemicellulose on serum lipids

Table 4-1 Composition of Corn Hemicellulose

Moisture	5.6	
Crude Protein	2.5	(3.6) ^a
Crude Fat	n.d. ^c	
Ash	1.5	(1.7)
Starch	n.d. ^c	
Cellulose ^b	0.1	(0.1)
Hemicellulose ^b	88.4	(93.6)
Lignin ^b	0.9	(1.0)
Hexose ^b	21.0	(22.1)
Pentose ^b	61.2	(64.4)
Uronic Acid ^b	3.0	(3.2)

^a Percentage on a dry matter basis.

^b Determined by the method of Southgate.

^c Not detected.

Table 4-2 Effect of Corn Hemicellulose Supplementation on Human Fecal Flora

Bacterial group	Pre-control period		Hemicellulose supplementation period		Post-control period	
	Day 7	Day 10	Day 7	Day 10	Day 7	Day 10
Bacteroidaceae	10.2±0.1 (9/9)*	10.5±0.1 (9/9)	10.4±0.2 (9/9)	10.5±0.3 (9/9)	10.6±0.4 (9/9)	10.4±0.2 (9/9)
Eubacteria	10.1±0.2 (9/9)	10.1±0.2 (9/9)	10.1±0.2 (9/9)	10.2±0.2 (9/9)	10.0±0.2 (9/9)	10.1±0.2 (9/9)
Peptococcaceae	9.9±0.2 (9/9)	9.8±0.3 (9/9)	9.8±0.3 (9/9)	9.6±0.2 (9/9)	9.6±0.3 (9/9)	9.8±0.5 (9/9)
Bifidobacteria	10.2±0.2 (9/9)	10.1±0.3 (9/9)	10.3±0.2 (9/9)	10.4±0.3 (9/9)	10.2±0.2 (9/9)	10.3±0.2 (9/9)
Veillonellae	7.5±0.7 (6/9)	7.6±1.5 (6/9)	8.1±0.9 (6/9)	7.6±0.8 (6/9)	7.9±0.4 (5/9)	7.6±0.2 (5/9)
Megasphaerae	7.9 (1/9)	8.2 (1/9)	8.1 (1/9)	8.0 (1/9)	7.2 (1/9)	6.5 (1/9)
<i>Clostridium perfringens</i>	4.0±0.9 (5/9)	5.3±0.6 (5/9)	3.9±0.5 (4/9)	4.0±0.5 (4/9)	4.6±0.6 (5/9)	4.2±0.4 (4/9)
<i>Clostridium</i> - others	6.8±2.7 (9/9)	7.1±1.4 (9/9)	6.4±0.4 (9/9)	6.5±1.2 (9/9)	7.0±1.0 (9/9)	7.2±1.4 (9/9)
Lactobacilli	5.0±1.9 (8/9)	5.4±1.4 (8/9)	5.1±1.5 (8/9)	5.2±1.1 (8/9)	5.0±1.2 (8/9)	5.1±1.0 (8/9)
Enterobacteriaceae	6.7±1.1 (9/9)	6.7±1.0 (9/9)	6.1±0.6 (9/9)	6.0±0.8 (9/9)	6.9±0.7 (9/9)	6.7±1.2 (9/9)
Enterococci	6.3±0.9 (9/9)	7.2±0.6 (9/9)	6.3±0.9 (9/9)	6.5±0.7 (9/9)	6.6±0.9 (9/9)	6.4±0.7 (9/9)
Staphylococci	2.8±0.4 (2/9)	3.4±0.8 (3/9)	3.2±0.4 (2/9)	2.8±0.4 (2/9)	3.2±0.5 (3/9)	3.0±0.4 (2/9)
Bacilli	<2.0 (0/9)	<2.0 (0/9)	<2.0 (0/9)	<2.0 (0/9)	<2.0 (0/9)	<2.0 (0/9)
Yeasts	3.7±1.0 (4/9)	3.7±0.8 (4/9)	3.7±1.0 (4/9)	3.5±0.8 (3/9)	4.1±1.4 (4/9)	3.9±1.8 (3/9)
Total counts	10.9±0.1	10.8±0.1	10.9±0.1	10.9±0.2	11.0±0.3	10.9±0.2

Values are means±SD of log bacterial counts per gram of wet feces (n=9).

* Frequency of occurrence.

1 序 論

これまで2～4章において、コーンファイバーとコーンファイバー中に含まれている水溶性ヘミセルロースの腸内環境に及ぼす影響を調べてきた。その結果、コーンファイバー投与によって著しく糞便重量が増加し、菌群レベルでの糞便菌叢の変化は認められなかったが、腐敗産物、有害酵素活性などの腸内細菌代謝産物が減少し、糞便pHが低下することが確認された。また、コーンファイバー中のヘミセルロースを抽出して投与してもコーンファイバー投与と同様に、糞便重量が増加して菌群レベルでの糞便菌叢の変化は認められなかったが、糞便腐敗産物、糞便有害酵素活性が減少し、糞便pHは低下した。このように、水溶性食物繊維のヘミセルロースと水不溶性食物繊維のコーンファイバー投与によってほぼ同様の結果が得られたことから、コーンファイバー投与による生理効果は、消化管内で溶出したヘミセルロースが、腸内細菌の代謝に影響を及ぼしていることが考えられる。本章では、消化管中でコーンファイバーとヘミセルロースがヒト消化酵素と腸内細菌から受ける現象を*in vitro*で検証することを目的として、コーンファイバーとヘミセルロースの人工消化試験とヒトの腸内菌叢を構成している各種分離株を用いた資化性試験を行った。

2 材料および方法

1) 人工消化試験

人工消化試験は、岡田らの方法を参考にして行った⁽¹⁰¹⁾。コーンファイバー、ヘミセルロースには、まだ少量の澱粉が夾雑しているため、これを除去する目的で0.1%グルコアミラーゼ(ナガセ)中に懸濁または溶解して、pH6.0、24時間加温した。100℃、30分間煮沸して酵素を失活した後、セルロースチューブに入れて蒸留水を用いて3日間透析を行い凍結乾燥し

て得られた標品を以下の実験に用いた。

アミラーゼ活性は、0.096%可溶性澱粉からpH 6.0, 37℃で1分間に1.0 μmol のブドウ糖に相当する還元糖を生成する酵素量を1単位とした。マルターゼ活性は、0.9%マルトースからpH 6.0, 37℃で1分間に2.0 μmol のブドウ糖を生成する酵素量を1単位とした。

まず、コーンファイバー、ヘミセルロースを純水に各々10%になるように懸濁、溶解して、pH 6.0に調整した。これに60u/gの α -アミラーゼ活性に相当するヒト唾液を添加して37℃, 60分間加温した。この唾液は、2名の成人男子から採取、混合した後、0.45 μm のメンブランフィルター（ミリポア）で濾過して用いた。次に、胃における条件を再現するため1N塩酸を添加してpH 2.0に調整、37℃, 60分間加温した。その後、10% NaHCO_3 を用いてpH 7.0に調整、400u/gの α -アミラーゼ活性に相当するブタ唾液粉末(Sigma)を添加して37℃, 6時間加温した。さらに86u/gのマルターゼ活性に相当するブタ小腸アセトン粉末(Sigma)を添加して、37℃, 3時間加温した。

各反応において、反応液を3000rpm, 5分間の遠心分離を行い、上澄の還元糖量をSomogy-Nelson法によって測定した^(107, 108)。両サンプルの加水分解量は、各段階での還元糖量の増加量を測定して調べた。

還元糖量の増加が認められた反応段階では、生成物を調べるためにMW: 10000のディスポーザブル限外濾過器（東ソー）に反応液を入れ、シリンジを用いて加圧濾過した。濾液中の還元糖量を測定した後、濾液に塩酸を5%になるように添加して、2時間煮沸によって加水分解後、ペーパークロマトグラフィー（展開溶媒：n-ブチルアルコール-ピリジン-水(3:2:2 v/v)）によって構成糖を調べた⁽¹⁰⁹⁾。また、濾液に澱粉定量キット（ペーリンガー・マンハイム）を用いてグルコアミラーゼ処理した時に遊

離してくるブドウ糖を酵素法で測定して、濾液中の α -1,4, α -1,6結合を有する澱粉と澱粉糖を定量した。

2) 資化試験

理化学研究所動物薬理研究室で分離、保存してあった、ヒト糞便由来の13菌群、42菌種、110株の腸内細菌叢を構成している菌株を用いて糖資化試験を行った^(10, 32)。EGLFスラントで継代保存してあった各菌株を、EG寒天平板培地に白金耳を用いて塗抹して、嫌気ジャーで35℃、2日間培養を行い、得られたコロニーは、EGF液体培地に接種した。EGF液体培地は、接種直前に100℃、5分間加熱によって脱気を行い、急冷後接種して嫌気ジャーで37℃、2日間培養した。培養終了後、再度新しいEGF液体培地9mlに培養菌液を0.3mlずつ接種して、嫌気ジャーで37℃、2日間増菌培養したものを供試菌液とした。

糖分解試験用培地(PYF液体培地)に、除澱粉処理した両サンプルを0.5%になるように添加して、前述のEGF液体培地と同様に接種直前に100℃、5分間加熱した後、急冷して脱気を行った。EGF液体培地で増菌した前述の供試菌液を0.3mlずつ接種、嫌気ジャー中で37℃、2日間培養した。資化の判定は、ヘミセルロースではpHの低下と濁度(OD 550nm)の増加について、コーンファイバーではpHの低下のみについて、糖を添加していないPYF培地とブドウ糖を0.5%添加したPYF培地のpH、濁度を対照として行った。なお、本実験に使用した各々の培地の組成は巻末に示す。

3 結果

1) 人工消化試験

人工消化試験の結果をTable 5-1に示す。ヒト唾液、ブタ小腸アセトン粉末処理によって、コーンファイバー、ヘミセルロースは共に還元糖量

が増加した。この時、限外濾過の濾液中に増加した生成物の構成糖はブドウ糖であり、この濾液中の生成物をグルコアミラーゼ処理してもブドウ糖が得られた。コーンファイバーからは、人工胃液（塩酸）処理によって還元糖の増加が認められたが、限外濾過の濾液中の還元糖量は増加していなかった。しかし、限外濾過膜を通過しなかった高分子画分に、キシロース、アラビノースを構成糖とする水溶性の多糖類の出現が検出された。

2) 資化性試験

Table 5-2 に、ヒト腸内細菌叢を構成する110菌株を用いた資化性試験の結果を示す。コーンファイバーは、総べての菌株によって資化されなかった。ヘミセルロースは、一部の *Bacteroides*, *Clostridium*、特に *B. distasonis* によって利用されたが、他の菌種には資化されなかった。

4 考察

ヒトの消化管は、口から始まり肛門まで続いている⁽¹¹⁰⁾。口から入った糖質は、まず口腔内で唾液の α -アミラーゼの作用を受け、次に胃の胃酸によって強い酸性下にさらされる。十二指腸では、重炭酸によって弱アルカリ性に調整され膵液中の α -アミラーゼの作用を受けた後、小腸に達して小腸上皮細胞のマルターゼなどの加水分解酵素の作用を受ける。これまでの過程で分解された糖質は、小腸から吸収されるが、加水分解されなかった未消化物は結腸に送られる。結腸までの消化管内には非常に細菌が少ないが、結腸には多数の各種腸内細菌が寄生していて、未消化物は結腸と盲腸を往復攪拌されながら腸内細菌による分解、発酵を受け、短鎖脂肪酸が生成するためpHが低下する。その後、結腸から直腸に内容物が移動し、急速に水分が吸収され糞便が形成される。結腸、直腸内で生成された短鎖脂肪酸は一部は吸収されるが、大部分は結腸、直腸の上皮細胞によって利

用される。むしろ、腸内細菌の生成する酪酸は、大腸上皮細胞の主なエネルギー源であり、抗生物質投与などによって腸内細菌が抑制された場合は、酪酸の不足によって大腸上皮細胞がエネルギー不足になるため、大腸の機能を維持できずに下痢を引き起こすことが知られている⁽¹¹⁰⁾。本実験では、人工消化試験は口から小腸までの現象、糖分解試験は大腸内での現象を *in vitro* で検証する目的で行った。

コーンファイバー、ヘミセルロース共に唾液、小腸アセトン粉末処理によって還元糖が増加したが、これはブドウ糖とブドウ糖を構成糖としたオリゴ糖の生成によることから、夾雑している澱粉の加水分解生成物によるものと推察される。コーンファイバー中の澱粉は、細胞壁に囲まれタンパク質と結合しているために酵素によって分解され難く、グルコアミラーゼによる除澱粉処理によっても完全に除去できなかったと考えられる。Eastwoodらは、このような細胞壁組織と共に摂取される澱粉のほうが腸内細菌代謝に大きな影響を与えると推論しているが⁽¹¹¹⁾、本実験においてもこのような澱粉が酵素によって分解され難いことが確認された。澱粉は多くの腸内細菌に容易に利用されることから、コーンファイバー投与によって、ファイバー中の澱粉が加水分解され難く一部が消化吸収されずに大腸に到達して、これがコーンファイバーの生理効果の一因となっていることも考えられる。

また、人工胃液中でコーンファイバーからは、アラビノースとキシロースから構成された水溶性多糖が少量溶出し、この多糖類はその構成糖からヘミセルロースであると考えられる。本実験の *in vitro* の実験系が、どの程度ヒト消化管内での現象を再現しているかは明かではないが、胃においてヘミセルロースが溶出することを確認した。これは、食物繊維がその物理的な性質によって生理機能を発揮すると考えられている回腸、空腸に

において、水溶性のヘミセルロースと水不溶性の残渣が共存して作用することを意味する。

ヘミセルロースは一部の腸内細菌によって資化されたが、コーンファイバーはこれらの菌に資化されなかった。ヘミセルロースの主鎖は、キシロースが β -1,4結合したキシランであることから⁽¹¹²⁾、この資化にはキシラナーゼが関与していると考えられる。ヘミセルロースを資化したキシラナーゼ活性を有すると考えられる腸内細菌にも、コーンファイバーが資化されなかったことから、細胞壁を構成している未遊離の水不溶性ヘミセルロースは、溶出した水溶性のヘミセルロースより腸内細菌に分解、利用され難いことを確認した。

青江らは、米ヌカ、小麦フスマ、大麦ヌカ、ハトムギヌカから各々ヘミセルロース標品を調製して、腸内細菌による資化性とラットにおける盲腸内菌叢の変動について報告している⁽¹¹³⁾。上記4種のヘミセルロース標品は、トウモロコシのヘミセルロースと同様にアラビノース、キシロースを構成糖とした多糖類であるが、その腸内細菌による資化性は標品によって異なり、米ヌカヘミセルロースは、*Bifidobacterium*, *Escherichia coli*によく資化されるが、小麦フスマヘミセルロースは、一部の*Bifidobacterium*、ハトムギヌカヘミセルロースは*B. fragilis*にのみ資化され、大麦ヌカヘミセルロースは、総ての菌に資化されなかった。この資化性の多様性は、各々の構造の違いに起因していると考えられる。トウモロコシのヘミセルロースは、ハトムギヌカ、大麦ヌカのヘミセルロースの資化性に似ているが、実験に用いた菌種、菌株が異なることから単純に比較はできない。このように構成糖が比較的類似している多糖類でも、微生物による資化性が異なることから、食物繊維の腸内細菌による利用性と糖組成、構造に関する研究が必要だと考えられる。

5 要約

ヒト消化管内でのコーンファイバー、ヘミセルロースの状態を *in vitro* の実験系で再現する目的で、人工消化試験と腸内細菌による資化性試験を行った。コーンファイバー、ヘミセルロース共に唾液、小腸アセトン粉末によって、夾雑する澱粉由来と考えられるブドウ糖とブドウ糖を構成糖とするオリゴ糖が生成した。また、人工胃液では、コーンファイバーからヘミセルロースと考えられるアラビノースとキシロースを構成糖とした水溶性多糖が溶出した。また、コーンファイバーは、ヒト腸内菌叢を構成している110種の菌株によって資化されなかったが、ヘミセルロースは一部の *Bacteroides*, *Clostridium*、中でも特に *B. distasonis* によって資化された。

6 図および表

	Artificial Gastric Juice (pH 1)	Artificial Intestinal Juice (pH 7)
Artificial Gastric Juice (pH 1)	0.1	0.3
Artificial Intestinal Juice (pH 7)	0.1	0.3
Artificial Gastric Juice (pH 1) + Artificial Intestinal Juice (pH 7)	0.2	0.3
Artificial Gastric Juice (pH 1) + Artificial Intestinal Juice (pH 7) + Artificial Intestinal Juice (pH 7)	0.2	0.3

Table 5-1 Digestivity *in vitro*. of Corn Fiber and Hemicellulose

	Corn Fiber	Hemicellulose
Human Saliva	0.4	0.3
Artificial Gastric Juice (HCl)	0.3	0.0
Porcine Pancreas	0.0	0.0
Porcine Intestinal Acetone Powder	0.2	0.1

Values are degradation ratio (%) = increased reducing sugar / total sugar \times 100.

Table 5-2 Utilization of corn fiber and hemicellulose by 110 of intestinal bacteria

Bacterial Species	No. of Strains	Corn Fiber	Hemicellulose	Bacterial Species	No. of Strains	Corn Fiber	Hemicellulose
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5	0	0	<i>Clostridium bifermentans</i>	1	0	0
<i>infantis</i>	2	0	0	<i>coccoides</i>	1	0	0
<i>breve</i>	3	0	0	<i>paraputrificum</i>	2	0	0
<i>adolescentis</i>	5	0	0	<i>difficile</i>	2	0	0
<i>longum</i>	5	0	0	<i>ramosum</i>	3	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3	0	0	<i>perfringens</i>	5	0	1
<i>salivarius</i>	2	0	0	<i>butyricum</i>	3	0	2
<i>casei</i>	2	0	0	<i>innocuum</i>	1	0	0
<i>gasseri</i>	1	0	0	<i>clostridiforme</i>	2	0	1
<i>Bacteroides fragilis</i>	4	0	1	<i>Fusobacterium varium</i>	1	0	0
<i>thetaiotaomicron</i>	3	0	0	<i>necrogenes</i>	1	0	0
<i>vulgatus</i>	3	0	0	<i>Peptostreptococcus anaerobium</i>	1	0	0
<i>distasonis</i>	5	0	4	<i>productus</i>	4	0	0
<i>uniformis</i>	1	0	1	<i>parvulus</i>	2	0	0
<i>melaninogenicus</i>	1	0	0	<i>Propionibacterium acnes</i>	2	0	0
<i>ovatus</i>	2	0	0	<i>Eubacterium lentum</i>	3	0	0
<i>Mitsuokella multiacidus</i>	2	0	0	<i>limosum</i>	5	0	0
<i>Echerichia coli</i>	5	0	0	<i>aerofaciens</i>	5	0	0
<i>Megamonas hypermegas</i>	1	0	0	<i>elgens</i>	1	0	0
<i>Veillonella parvula</i>	3	0	0	<i>contortum</i>	1	0	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	2	0	0	<i>moniliforme</i>	1	0	0

6 章. コーンファイバーからヘミセル ロースを抽出した残渣投与のヒ ト糞便菌叢, 糞便酵素活性に及 ぼす影響

1 序 論

1, 2, 3 章においてコーンファイバー投与のヒト腸内環境に及ぼす影響、すなわち滞腸時間の短縮、糞便中の有害腐敗産物の減少、発ガンに関与していると考えられている β -グルコシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ニトリリダクターゼ活性の低下を確認した。また、5 章ではコーンファイバー中に含まれている水溶性ヘミセルロース投与のヒト腸内環境に及ぼす影響を調べた結果、 β -グルコシダーゼ活性以外はコーンファイバー投与の結果とほぼ一致した。6 章では、コーンファイバーとヘミセルロースの人工消化試験および腸内細菌叢を構成しているヒト分離保存菌株110株を用いた *in vitro* の資化試験において、両サンプルとも消化酵素により消化分解され難く、微生物にも利用され難いが、ヘミセルロースは一部の *Bacteroides*, *Clostridium*、特に *B. distasonis* によく利用されることを確認した。また、コーンファイバーから胃酸 (HCl) によってヘミセルロースが溶出することを確認した。

腸内の有害代謝抑制が、どのような機構で起こっているのかは明かではないが、糞便 pH が低下している点からコーンファイバーの一部が腸内細菌に分解、利用され菌群レベルでは検出できない菌叢の変化、またはこれらの代謝活性を有している菌の代謝を修飾していると考えられる。腸内細菌がコーンファイバーのどの部分をどのようにして資化するかは不明であるが、5 章の人工消化試験の人工胃液中でヘミセルロースが溶出する点、また、*in vitro* の資化性の結果から溶出した水溶性のヘミセルロースのほうがコーンファイバーより腸内細菌に資化され易く、コーンファイバー投与の腸内細菌代謝に及ぼす影響は、むしろコーンファイバー本体の効果ではなくコーンファイバー中のヘミセルロースに起因していることが推察される。

消化管中でコーンファイバーから水溶性ヘミセルロースが溶出した残りの残渣も、水不溶性食物繊維として働き、ヘミセルロースと同様に腸内細菌の作用を受けると考えられるが、この水不溶性残渣画分がどのような影響を腸内環境に与えるかは明らかでなく、コーンファイバー投与の生理効果がヘミセルロースのみに起因するのか、ヘミセルロースと残渣の相互作用によるのかが不明である。

本章では、消化管内でヘミセルロースが溶出した後のコーンファイバー残渣画分の腸内環境に及ぼす影響を調べる目的で、実験室でコーンファイバーから水酸化カルシウムでヘミセルロースを抽出した残渣を調製して、6名の健康成人に投与して腸内環境に及ぼす影響を調べた。

2 材料および方法

1) 被験者および実験計画

6名(26~32歳、平均28.0歳)の健康な研究所勤務で、同じメニューの和洋折衷の米を主食とした食事(摂取熱量: 2200kcal/日、総摂取熱量に占める脂肪の熱量比: 31.0%、食物繊維摂取量: 19.0g/日)を摂っている成人男子に、コーンファイバー残渣を1日5g投与した。各被験者は、実験開始前2カ月以内に抗生物質などの薬剤を服用していなかった。

実験スケジュールをFig. 6-1に示す。まず、対照としてコーンファイバー残渣を投与しない各被験者の通常の食事の前対照期を10日間、次に毎食後に1日5gのコーンファイバー残渣を懸濁した温飲料(コーヒーなど)を投与したコーンファイバー残渣投与期10日間、最後に再度コーンファイバー残渣の投与を中止した後対照期を10日間行った。各実験期の6日間(5~10日目)の糞便を全量採取して糞便重量、pHを測定、また、各実験期2回(7, 10日目)の糞便を採取して、糞便菌叢、水分含量、酵素活性

(β -グルコシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ)、アンモニア含量を調べた。

なお、本実験はヘルシンキ宣言の精神に則って行った⁽⁶⁵⁾。

2) コーンファイバー残渣の調製

5章で行ったヘミセルロースの調製法に準拠してコーンファイバー残渣を調製した。その方法をFig. 6-2に示す。コーンファイバーを2%水酸化カルシウム水溶液に懸濁して80℃、6時間加熱攪拌した後、3000rpm、10分間の遠心分離によって抽出液と残渣に分離した。残渣を再度新しい2%水酸化カルシウム水溶液に懸濁、80℃、6時間加熱し、3000rpm、10分で遠心分離を行って残渣を分離する操作を3回繰り返した。残渣を3倍量の水に懸濁して遠心分離した後、水に再懸濁し透析チューブに入れ2日間透析した後、真空凍結乾燥機で乾燥、粉碎した。

このコーンファイバー残渣と抽出に用いたコーンファイバーの分析を、3章と同様に一般成分を常法によって行い、食物繊維の分析はProskyの方法⁽⁶⁶⁾とVan Soestの方法^(57, 58)によって行った。コーンファイバー残渣とコーンファイバーの走査型電子顕微鏡写真を、金パラジウム合金をスパッタした後、倍率 $\times 300$ の走査型電子顕微鏡(日立⁽⁶⁾ S-2100A, 20kV)を用いて電顕写真を撮影した⁽¹¹⁴⁾。

3) 糞便菌叢の解析

糞便菌叢の解析は、2章と同様に光岡の方法⁽⁶⁷⁾によって行った。

4) 糞便性状、アンモニア含量の測定

各実験期6日間(5~10日目)の糞便を全量採取して糞便重量、pHを測定した。また、各実験期2回(7, 10日目)の糞便を用いて、4章と同様の方法によって、アンモニア含量、糞便水分、 β -グルコシダーゼ活性、 β -グルクロニダーゼ活性を測定した。

5) データの統計解析

菌数については、湿糞便 1 g 当たり に換算して常用対数で表した。他の測定項目は、各実験期 2 回の測定値を平均し平均値±標準偏差で示し、平均値の差は Student の Paired *t*-test によって危険率 5 % で有意差を検定した。糞便菌叢の各菌群の出現率の差は、Fisher の直接確率計算法によって有意差を検定した。

3 結果

1) コーンファイバー、コーンファイバー残渣の分析値、走査型電顕写真

今回調製したコーンファイバー、コーンファイバー残渣の分析値を、Table 6-1 に示す。コーンファイバー残渣は、コーンファイバーに較べてヘミセルロースの割合が減少して、セルロースとリグニンの割合が増加していたが、コーンファイバー残渣中には水溶性ヘミセルロースが約 5 % 残存していた。Fig. 6-3 にコーンファイバーとコーンファイバー残渣の走査型電顕写真を示す。これらの写真から、トウモロコシ外皮細胞の細胞壁から構成されているコーンファイバーと、コーンファイバーの細胞壁からヘミセルロースが溶出されてセルロースの骨格だけになったコーンファイバー残渣の様子が認められる。

2) 糞便菌叢の構成

各実験期間中 2 回の糞便菌叢の解析結果を Table 6-2 に示す。各腸内菌叢を構成する菌群レベルでの菌数にコーンファイバー残渣投与の影響は認められなかった。

3) 糞便酵素活性、アンモニア含量、糞便性状の変化

Fig. 6-4 に糞便水分と糞便 pH の変化を示す。糞便水分含量は、コーンファイバー残渣投与によって変化しなかった。また、糞便 pH もコーンファ

イバー残渣投与によって変化しなかった。

糞便酵素活性の変化をFig. 6-5に示す。 β -グルクロニダーゼ活性は、コーンファイバー残渣投与によって糞便1g当たりの活性がやや減少したが、1日当たりの総排泄活性は変化しなかった。 β -グルコシダーゼ活性は、コーンファイバー残渣投与によって糞便1g当たりの活性も1日当たりの総排泄活性も増加した。これらの酵素活性の変化は、総て有意な変化ではなかったが、コーンファイバー残渣投与の中止によって前対照期のレベルまで戻った。

Fig. 6-6に糞便アンモニア含量と糞便重量を示す。糞便中アンモニア含量は、コーンファイバー残渣投与によって糞便1g当たりの濃度は減少したが、1日当たりの排泄量は変化しなかった。糞便重量はコーンファイバー残渣投与によって増加する傾向を示し、投与中止によって前対照期のレベルまで戻った。

4 考察

本実験で用いたコーンファイバー残渣には、水溶性ヘミセルロースが約5%含まれていたが、これは水酸化カルシウムでコーンファイバーから抽出したヘミセルロースの一部が水洗除去不十分なために残留したものと考えられる。コーンファイバー残渣調製時の洗浄は3回繰り返して行ったが、抽出された水溶性ヘミセルロースが高粘度であるために本実験に用いた調製方法では、完全に除去することはできなかったと考えられる。

コーンファイバー中に含まれているヘミセルロースには、希アルカリ、希酸によって容易に抽出されるヘミセルロースB画分と抽出されないA、C画分があり、コーンファイバー残渣中の水不溶性ヘミセルロースは後者に相当すると考えられる⁽¹⁾⁽²⁾。これらの水不溶性ヘミセルロースは、セ

ルロース、リグニンと共に残渣の構造を形成したまま大腸に達して腸内細菌の作用を受ける。このようにヒト腸管内におけるヘミセルロースの溶出には、胃や十二指腸内でのpH変化による溶出と大腸内で腸内細菌の分解による溶出の2種類の経路があると考えられる。しかし、*in vitro*の質化試験の結果では、コーンファイバー中の水不溶状態のヘミセルロースは、水溶性ヘミセルロースより腸内細菌に質化され難いことが確認され、腸内細菌代謝には消化管上部で溶出した水溶性ヘミセルロースの影響が大きいと考えられる。

残渣投与によってコーンファイバーと同様に糞便重量が増加、糞便pHは変化せず、菌群レベルでの糞便菌叢にも変化が認められなかった。また、糞便アンモニア含量と β -グルクロニダーゼ活性は糞便1g当たりは減少したが、1日当たりの排泄量は変動しなかった。この変動は、腸内細菌によるアンモニアと β -グルクロニダーゼの生産量の減少ではなく、増加した糞便による希釈されたためであると考えられる。糞便1g当たりの濃度の低下によってアンモニアは腸管からの吸収量の低下し、 β -グルクロニダーゼは、酵素と共に基質、生成物も希釈されることから相乗的に有害代謝の抑制に効果的である。 β -グルコシダーゼ活性は糞便1g当たりの活性は変化しなかったが、1日当たりの総排泄活性が増加した。もし、アンモニアと β -グルクロニダーゼの場合と同様に β -グルコシダーゼの生成量が増加しなかったならば、増加した糞便によって希釈され糞便1g当たりの活性が減少するはずである。腸内細菌の β -グルコシダーゼの生成量はコーンファイバー残渣投与によって増加したと考えられるが、コーンファイバー残渣に約50%含まれるセルロースによって酵素活性が誘導されたと考えられる。また、3章におけるコーンファイバー投与では、 β -グルコシダーゼ活性が増加しなかった。これは、コーンファイバーの構造が、セ

ルロース骨格の周囲をヘミセルロースが被っていると考えられていることから⁽¹⁾⁽²⁾、胃内で一部のヘミセルロースが溶出するが、その溶出が不完全なために、 β -グルコシダーゼ生産菌がセルロースに接触できず、活性が誘導されないと考えられる。

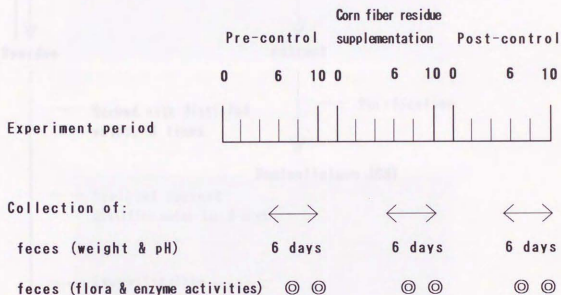
以上の結果より、コーンファイバー投与の腸内環境に与える影響の中で、糞便重量の増加は溶出した水溶性ヘミセルロースと不溶性の残渣の相互作用であると考えられる。しかし、5章における *in vitro* の実験において水溶性ヘミセルロースの溶出量が少なかった点と水溶性ヘミセルロースよりコーンファイバーのほうが資化し難いことから、糞便重量の増加については残渣の影響がより大きいと考えられる。また、腸内有害代謝の抑制については、腸内細菌に利用され易い水溶性ヘミセルロース単独の効果と考えられる。また、腸内細菌の代謝に関与する基質、酵素が増加した糞便によって希釈されるために相乗的に有害代謝産物の生成が抑制され、さらに生成した有害代謝産物も同様に希釈され大腸からの吸収や大腸上皮組織に及ぼす影響も抑制されるであろう。このように、腸内細菌の有害代謝活性を抑制するのは、直接的には溶出した水溶性ヘミセルロースの効果であるが、不溶性残渣も物理的に糞便量を増加させることによって相互的に腸内細菌が宿主に及ぼす悪影響を抑制していることが確認された。

5 要約

コーンファイバーから水酸化カルシウムで水溶性ヘミセルロースを抽出した残りのコーンファイバー残渣を調製して、6名の健康な成人男子に1日5g、10日間投与した。コーンファイバー残渣投与によって糞便重量、 β -グルコシダーゼ活性が増加したが、糞便pH、 β -グルクロニダーゼ活性、アンモニア含量、菌群レベルでの糞便菌叢は、特に顕著な変化を示さな

った。しかし、 β -グルクロニダーゼ活性、アンモニア含量は、増加した糞便量によって希釈され糞便 1 g 当たりの濃度が減少した。

6 図および表



Subjects: n=6 (♂ 6), age; 26-32.

Fig. 6-1 Experimental program

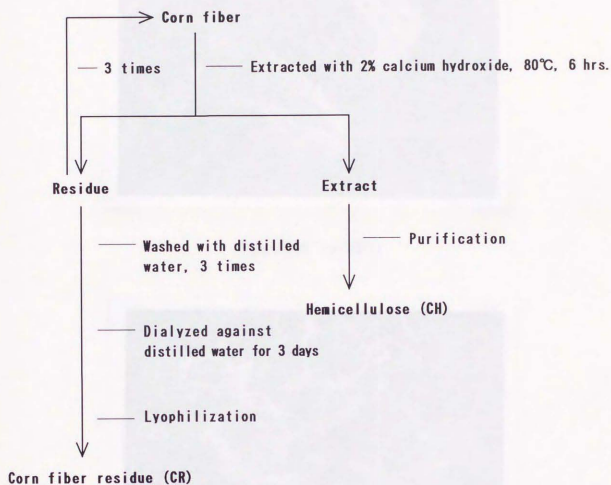
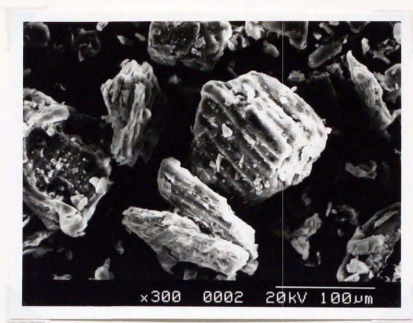


Fig. 6-2 Scheme for preparation of corn fiber residue

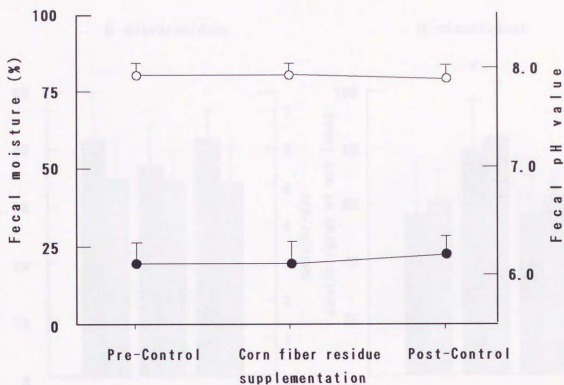


Corn Fiber (× 300)



Corn Fiber Residue (× 300)

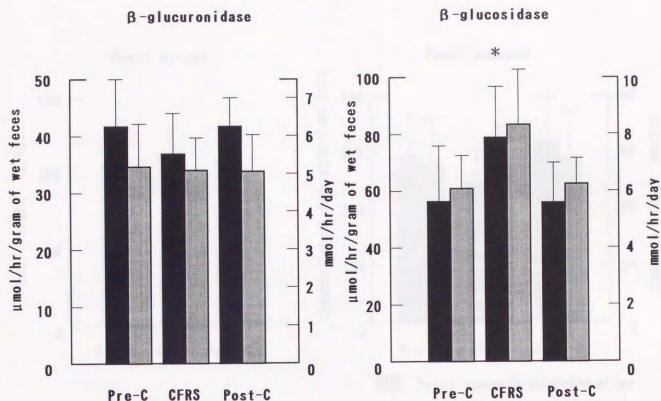
Fig. 6-3 The Scanning Electron Micrographs of Corn Fiber and Residue



○:Fecal moisture content, ●:Fecal pH value

Values are means \pm SD (n=6)

Fig. 6-4 Effect of corn fiber residue on fecal water and pH



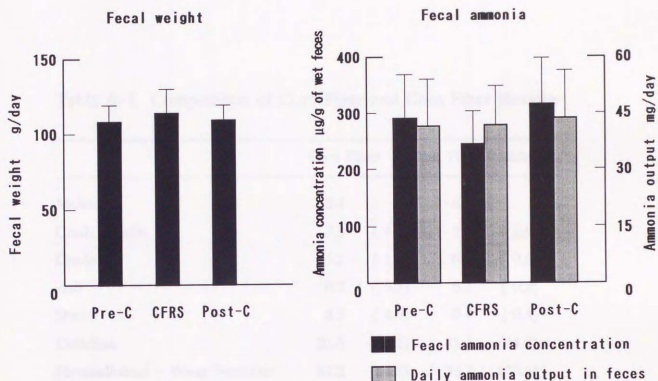
■ Enzyme activities per 1g of wet feces

▒ Enzyme activities of daily output

Pre-C: Pre-Control period, CFRS: Corn fiber residue supplementation period, Post-C: Post-Control period. Each column represents twice of 6 subjects' data as means \pm SD.

* Significantly different from both control periods ($p < 0.05$)

Fig. 6-5 Effect of corn fiber residue on fecal enzyme activities



Each column represents twice of 6 subjects' data as means \pm SD

Pre-C: Pre-Control period, CFRS: Corn fiber residue supplementation period,
Post-C: Post-Control period

Fig. 6-6 Effect of corn fiber residue on fecal weight and ammonia content

Table 6-1 Composition of Corn Fiber and Corn Fiber Residue

	Corn Fiber	Corn Fiber Residue
Moisture	5.4	6.8
Crude Protein	3.8 (4.6) ^a	2.4 (2.6)
Crude Fat	1.2 (1.3)	0.1 (0.1)
Ash	0.2 (0.3)	0.3 (0.3)
Starch	4.3 (4.5)	0.4 (0.4)
Cellulose	21.0 (22.1)	41.4 (44.4)
Hemicellulose - Water Insoluble	61.2 (64.4)	33.1 (35.5)
Hemicellulose - Water Soluble	0.0 (0.0)	5.1 (5.5)
Lignin	3.0 (3.2)	5.1 (5.5)

^a Percentage on a dry matter basis.

Table 6-2 Effect of Corn Fiber Residue Supplementation on Human Fecal Flora

Bacterial group	Pre-control period			Corn fiber residue supplementation period			Post-control period	
	Day 7	Day 10	Day 7	Day 10	Day 7	Day 10	Day 7	Day 10
Bacteroidaceae	10.4±0.1 (6/6)*	10.6±0.1 (6/6)	10.4±0.1 (6/6)	10.5±0.2 (6/6)	10.6±0.3 (6/6)	10.5±0.1 (6/6)	10.5±0.1 (6/6)	10.5±0.1 (6/6)
Eubacteria	10.2±0.2 (6/6)	10.3±0.2 (6/6)	10.2±0.2 (6/6)	10.2±0.2 (6/6)	10.1±0.2 (6/6)	10.2±0.2 (6/6)	10.2±0.2 (6/6)	10.2±0.2 (6/6)
Peptococcaceae	9.6±0.1 (6/6)	9.8±0.3 (6/6)	9.7±0.2 (6/6)	9.6±0.2 (6/6)	9.7±0.3 (6/6)	9.6±0.4 (6/6)	9.7±0.3 (6/6)	9.6±0.4 (6/6)
Bifidobacteria	10.2±0.2 (6/6)	10.2±0.2 (6/6)	10.3±0.2 (6/6)	10.3±0.1 (6/6)	10.2±0.2 (6/6)	10.1±0.3 (6/6)	10.2±0.2 (6/6)	10.1±0.3 (6/6)
Veillonellae	7.5±0.5 (5/6)	7.4±1.0 (5/6)	7.1±0.9 (5/6)	7.2±0.8 (5/6)	7.6±0.6 (5/6)	7.3±0.2 (5/6)	7.6±0.6 (5/6)	7.3±0.2 (5/6)
<i>Clostridium perfringens</i>	4.0±0.6 (3/6)	4.3±0.5 (3/6)	3.9±0.5 (3/6)	4.2±0.5 (3/6)	4.1±0.7 (3/6)	4.0±0.4 (3/6)	4.1±0.7 (3/6)	4.0±0.4 (3/6)
<i>Clostridium</i> - others	6.9±2.7 (6/6)	7.2±2.4 (6/6)	6.4±2.4 (6/6)	6.5±2.2 (6/6)	7.0±1.0 (6/6)	6.2±1.4 (6/6)	7.0±1.0 (6/6)	6.2±1.4 (6/6)
Lactobacilli	5.2±1.4 (5/6)	5.1±1.2 (5/6)	5.1±1.5 (5/6)	5.2±1.4 (5/6)	5.1±1.3 (5/6)	5.1±1.2 (5/6)	5.1±1.3 (5/6)	5.1±1.2 (5/6)
Enterobacteriaceae	6.1±1.5 (6/6)	6.5±1.0 (6/6)	6.2±0.6 (6/6)	6.1±0.7 (6/6)	6.0±0.6 (6/6)	6.2±1.0 (6/6)	6.0±0.6 (6/6)	6.2±1.0 (6/6)
Enterococci	6.5±0.9 (6/6)	7.0±0.5 (6/6)	6.7±0.6 (6/6)	6.8±0.5 (6/6)	6.7±0.6 (6/6)	6.6±0.5 (6/6)	6.7±0.6 (6/6)	6.6±0.5 (6/6)
Staphylococci	2.2±0.4 (2/6)	3.4±0.8 (2/6)	2.2±0.4 (2/6)	2.1±0.4 (2/6)	2.2±0.3 (2/6)	2.5±0.2 (2/6)	2.2±0.3 (2/6)	2.5±0.2 (2/6)
Bacilli	<2.0 (0/6)	<2.0 (0/6)	<2.0 (0/6)	<2.0 (0/6)	<2.0 (0/6)	<2.0 (0/6)	<2.0 (0/6)	<2.0 (0/6)
Yeasts	2.7±1.0 (2/6)	2.4±0.6 (2/6)	2.7±1.0 (2/6)	2.5±0.8 (2/6)	3.1±1.0 (2/6)	2.6±1.8 (2/6)	3.1±1.0 (2/6)	2.6±1.8 (2/6)
Total counts	10.7±0.1	10.9±0.1	10.9±0.1	10.9±0.2	10.8±0.3	10.9±0.3	10.8±0.3	10.9±0.3

Values are means±SD of log bacterial counts per gram of wet feces (n=9).

* Frequency of occurrence.

栄養学的に“不必要”、むしろ消化吸収を阻害して消化管の組織に障害を与える有害なものとさえ考えられていた食物繊維は、近年の精製食品の摂取による各種成人病の多発によってその生理的役割が見直されてきている^(1, 5, 6)。しかし、その生理的意義、作用機序については、現象面の確認のみが先行してあまり解明されていない。食物繊維は滞腸時間を短縮して、また、消化吸収されずに大腸に到達することから大腸に常在している腸内細菌叢や、その代謝に影響を与えることが予想される。本論文では、食物繊維投与による腸内細菌叢とその代謝に及ぼす影響を調べる目的で、食物繊維素材としてトウモロコシ外皮から調製したコーンファイバーを用いて研究を行った。

まず1章では、ラットにコーンファイバーを添加した飼料と食物繊維を含まない飼料を投与して滞腸時間と糞便水分に及ぼす影響を調べた。その結果、コーンファイバー投与によって糞便水分、量が増加して滞腸時間が有意に短縮することを確認した。

2章では、コーンファイバーを通常の日本型食事を食べている健常成人に1日6、12g、10日間ずつ投与して、糞便菌叢、糞便重量、糞便中に排泄されたNDF量、pH、水分含量、 β -グルクロニダーゼ活性、血中脂質を測定した。コーンファイバー投与によって糞便菌叢、pH、血中脂質は、特に顕著な変化を示さなかったが、投与量に依存して糞便重量が増加し、同時にNDFの排泄量も増加した。糞便水分含量は、コーンファイバー投与によってやや減少したが、 β -グルクロニダーゼ活性は、投与量に依存して減少した。このように、コーンファイバー投与によって菌群レベルでの菌叢変化は認められなかったが、腸内細菌の代謝産物である β -グルクロニダーゼ活性が減少したことから、菌群レベルでは検出できないさらに細かいレベルでの菌叢の変化、またはこれらの代謝活性を有している細菌の代謝

が変化したことが示唆された。また、コーンファイバーの投与量に依存して糞便重量とNDF量が増加したことから投与したコーンファイバーは、あまり分解されずに糞便中に排泄され、糞便重量が増加することが確認された。糞便水分含量は2章の実験結果とは異なり、コーンファイバーの投与によってむしろ低下した。この差異は、実験対象であるラットとヒトの糞便水分含量の差に起因していると考えられる。すなわちラットの糞便は、元来、水分含量が低いと排泄されたコーンファイバーの保水性の影響が現れたが、ヒトの糞便は水分含量が多くコーンファイバーの保水性の影響が出難いと考えられる。

3章では2章の追試を兼ねて、食物繊維の生理効果がよりはっきり出るように成人病発症の低リスク食である低脂肪低食物繊維食を10日間、腸内環境が悪化すると予想される成人病発症の高リスク食である高脂肪低食物繊維食（実験的欧米食）を10日間、最後にこの高リスク食にコーンファイバーを1日18g負荷した高脂肪高食物繊維食を10日間投与して糞便菌叢、pH、水分含量、重量、腐敗産物、変異原活性、 β -グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ニトロリダクターゼ、糞便Ca、Zn、Fe排泄量、血中脂質を測定した。脂肪投与量の差による糞便菌叢の菌叢、腸内細菌代謝産物、糞便性状、血中脂質に対する顕著な影響は、予想に反して特に認められなかった。また、コーンファイバー投与によって3章と同様に菌叢の変化が認められなかったが、酵素活性、腐敗産物などの各種腸内細菌由来の有害代謝産物の減少が認められた。また、糞便重量が増加し糞便pHが低下したが、水分含量は変化しなかった。また、食物繊維摂取の弊害としてミネラルの吸着による吸収阻害が危惧されているが^(9.5)、コーンファイバー投与によってCa、Fe、Znの糞便中への排泄量が増加しなかったことから、コーンファイバー1日18g程度の投与量では特にミネラル吸収に影響を与えな

いことを確認した。これらのコーンファイバー投与による現象は、3章と同様に菌群レベルでは現れない菌叢変化または代謝活性を有する菌の代謝の変化によって、各種有害代謝が抑制されたと考えられる。これらの有害代謝産物は、発ガン、成人病の発症に関与すると考えられていることから⁽²⁹⁾、この代謝の抑制は宿主の健康の維持にとって重要である。さらにコーンファイバー投与によって糞便重量が増加するためにこれらの有害代謝産物が希釈され、相乗的にその有害性が抑制されることが考えられる。

4章では、コーンファイバー投与の腸内細菌代謝への影響は、コーンファイバー中に含まれていて酸やアルカリで溶出されてくる水溶性ヘミセルローズに起因すると仮説をたて、その検証を目的としてコーンファイバーから希アルカリ抽出した水溶性ヘミセルローズ標品を調製して、健康な成人に1日10g、10日間投与し糞便菌叢、pH、糞便重量、水分含量、 β -グルコシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ニトロリダクターゼ、アンモニア含量、血中脂質を測定した。コーンファイバー投与と同様にヘミセルローズ投与によって、菌群レベルでの顕著な菌叢変化は認められなかったが、 β -グルクロニダーゼ、ニトロリダクターゼ活性、アンモニア含量が低下、pHが低下、糞便重量がやや増加し、血中脂質は変化しなかった。しかし、コーンファイバー投与では低下した β -グルコシダーゼ活性は、ヘミセルローズ投与では変化しなかった。このようにヘミセルローズ投与による β -グルコシダーゼ以外の変動は、ほぼコーンファイバー投与の結果と一致することが確認された。

5章では、コーンファイバーとヘミセルローズ標品が消化管内で受ける現象を*in vitro*で再現する目的で、人工消化試験、ヒト腸内細菌叢を構成する110菌株を用いた資化性試験を行った。グルコアミラーゼを用いて除澱粉処理したにもかかわらず、コーンファイバー中に残存した澱粉は、

人工消化試験の唾液、小腸アセトン粉末によって少しずつ分解された。このようにファイバー中の澱粉は、酵素分解を受け難く一部がそのまま大腸にまで到達する可能性が示唆された。人工胃液中でコーンファイバーからヘミセルロースと考えられる、アラビノース、キシロースを主成分とした多糖類の溶出が認められた。また、ヒト腸内細菌叢を構成している110菌株による資化性試験において、コーンファイバーは、総ての菌に資化されなかったが、ヘミセルロースは、*Clostridium*, *Bacteroides*の一部、特に *B. distasonis*に資化されることが確認された。ヘミセルロースを資化可能な細菌は、キシラナーゼ活性を有していると考えられるが、このヘミセルロースを資化可能な菌株でもコーンファイバーを資化できなかったことから、コーンファイバー中の溶出していない水不溶な状態のヘミセルロースは、極めて腸内細菌に資化され難いと考えられる。

6章では、ヘミセルロースが溶出した後のコーンファイバーが、腸内環境にどのような影響を与えるかを調べる目的で、コーンファイバーから希アルカリを用いてヘミセルロースを抽出した残りの残渣を健康人に1日5g投与して、糞便菌叢、pH、重量、水分含量、 β -グルコシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、アンモニア含量を測定した。コーンファイバー残渣投与によって糞便菌叢、pH、水分含量、 β -グルクロニダーゼ活性、アンモニア含量は特に顕著な変化を示さなかったが、糞便重量、 β -グルコシダーゼ活性が増加した。これらの結果からコーンファイバー残渣は、コーンファイバー、ヘミセルロースとは異なり、腸内細菌の代謝に対し残渣の骨格を構成しているセルロースに誘導されたと考えられる β -グルコシダーゼ活性以外には、ほとんど影響を与えないことが確認された。コーンファイバー投与によって β -グルコシダーゼ活性が増加しなかったことから、セルロース骨格の周囲を被っているヘミセルロースが充分に除去されないとい

β -グルコシダーゼが誘導されないと考えられ、消化管内におけるコーンファイバーからの水溶性ヘミセルロースの溶出は、一部分であって完全なものではないことが示唆された。

以上の各章の結果からコーンファイバーの腸内環境に及ぼす影響は、以下に示すようなものだと考えられる。コーンファイバーは、口から消化管に入ると吸水によって軟化、膨潤し、胃の胃酸によって一部の水溶性ヘミセルロースが溶出し、水不溶性のコーンファイバー本体と共に小腸に達する。小腸では、コーンファイバー本体は、水不溶性食物繊維として物質の吸着、希釈などの作用をもたらす⁽²⁰⁾、ヘミセルロースは水溶性食物繊維として胆汁酸ミセルの形成阻害、粘度による物質の拡散の遅延化などの作用をもたらす⁽¹¹⁵⁾。コーンファイバー本体、ヘミセルロースは、共にヒトの消化酵素によって分解されずに大腸に達する。大腸の内容物は、一般に腸内細菌の菌体、剥離した消化管上皮細胞、大腸壁から分泌されるムチンなどを含む粘液、不消化物などから構成されていて、その内容量は特に不消化物の量に左右される⁽¹¹⁶⁾。コーンファイバー本体とヘミセルロースは、大量の水を保持したまま大腸に達するため大腸内容物を著しく増加し排泄までの時間が短縮される。また、大腸内に定着している腸内細菌によってコーンファイバー本体と水溶性ヘミセルロースの一部が、分解発酵され短鎖脂肪酸が生成して大腸内容物のpHが低下し⁽⁷²⁾、これらの短鎖脂肪酸、特にプロピオン酸は大腸の運動を活発にして排泄を促進すると考えられている⁽¹⁰²⁾。コーンファイバー摂取によって大腸内容物の増加と短鎖脂肪酸の生成の相乗作用によって滞腸時間が短縮されること考えられる。さらに滞腸時間の短縮、pHの低下によって腸内細菌叢の構成、代謝に影響を及ぼすことが考えられる。pHの低下によってEnterobacteriaceae, Clostridiumなどの有害菌が生育し難くなるが、Bifidobacterium, Lacto-

*bacillus*を中心とした有用な乳酸菌は生育可能であり、これらの乳酸菌の増加によってさらに大腸内容物のpHが低下し⁽¹¹⁷⁾、腸内腐敗などの有害代謝は、比較的代謝速度が遅いために滞腸時間の短縮によって著しく抑制されると考えられる。また、その作用機構は不明であるが水溶性ヘミセルロースは、腸内細菌の β -グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ニトロリダクターゼなどの有害酵素活性、腐敗産物生成を減少させる。さらにヘミセルロースによる直接的な腸内細菌による生成量の抑制に加えて、大腸内容物の増加によって反応基質、酵素が希釈されるために相乗的に反応が抑制され、その生成物も希釈されるために大腸からの吸収、大腸上皮組織に与える障害も減少する。このように、今まで単純に水不溶性食物繊維として扱われてきたコーンファイバーは、大腸の腸内細菌代謝に及ぼす影響に関して水溶性のヘミセルロースと水不溶性のコーンファイバー本体が相互的に働いて、水不溶性食物繊維以外の生理効果をもたらすことが確認された。本論文では検討しなかったが、コーンファイバーの摂取によってヒトの腸内細菌代謝を修飾することができたことから、他の腸内細菌が関与している代謝、2、3次胆汁酸への変換による胆汁酸の再吸収の阻害、ニトロソアミンなどの発ガン物質の生成、分解、薬物代謝などに影響を与える可能性も考えられる。

今まで一般的に食物繊維は、そのままの状態での水に対する溶解性から水溶性と不溶性に分類して、その生理効果も異なるとされてきた⁽²⁰⁾。本論文のコーンファイバーと同様に、今まで水不溶性食物繊維と分類されていた小麦フスマなどの植物細胞壁から構成されている食物繊維素材についても、消化管内で水溶性食物繊維が溶出することにより、水溶性食物繊維と不溶性食物繊維が相互的に働く可能性が考えられる。これまで報告されているこれらのフスマ類の生理効果、特にコレステロール代謝に対する影

饅頭のような水溶性食物繊維で顕著であると考えられている効果は、研究者、素材、対象によって結果が一致していない^(118, 119)。これらの小麦フスマやオーツフスマなどは、コーンファイバーとほぼ同様の構造、組成であるが、その収穫時期、土地、品種、加工によって多少の違いがあり、また、実験の対象となる動物差によって消化管内の条件が異なり、栄養条件によっても消化管内での水溶性多糖類の溶出量が異なると考えられることなどが、これらの実験結果のばらつきの一因となっていることが考えられる。

以上のように、これまで報告されている水不溶性植物細胞壁由来食物繊維の生理的実験は、素材の由来、加工精製の程度にあまり注意されていないが、本論文の結果のように水溶性多糖類の溶出が関与していることも考えられることから、実験に用いる食物繊維素材の由来にも注意を要することが示唆された。

コーンファイバーから溶出したヘミセルロースは大腸に達した後、一部が腸内細菌に利用され腸内菌叢の代謝を修飾、特に有害代謝を抑制することが確認された。腸内細菌は、大腸内に非常に安定したバランスで定着していて、ほぼヒトの肝臓に匹敵する代謝活性を持っていて⁽²⁹⁾、その代謝は、宿主に有益なものもあるが、発ガン物質、有害物質の生成、腐敗産物の生成、解毒物質の活性化などの有害なものも多数あり、むしろ全体的には有害であると考えられている⁽³⁰⁾。さらに疾病や老化によって、腸内菌叢が乱れて腐敗菌などの有害菌が増加してくると、その有害性はより強くなり宿主の健康状態をさらに悪化させる。コーンファイバーによって、このような腸内細菌の有害代謝を抑制できることは、健康の維持、成人病の予防、疾病の改善に大きな効果をもたらすと考えられる。

近年、コーンファイバーから抽出したヘミセルロースをキシラナーゼ処理した低粘度化ヘミセルロースが開発されている。この製品は、若干低分

子化されているために腸内細菌が質化し易いと考えられることから、腸内細菌に対する影響はより大きいと考えられる。また、コーンファイバーから消化管内で溶出するヘミセルロースは、全量ではなく一部分であることから、予め抽出し可溶化した低粘度化ヘミセルロースの摂取は、腸内環境の正常化に効果的であると考えられる。また、低粘度化ヘミセルロースと同時にコーンファイバーを摂取すれば、大腸内容の増加による希釈のために相乗的效果や滞腸時間の短縮効果も得られ効果的であると考えられる。

謝 辭

本研究は、理化学研究所動物薬理研究室、動物細胞・システム研究室、理化学研究所国際フロンティア研究システム生体ホメオスタシス研究グループフローラ研究チーム、千葉大学園芸学部農芸化学科栄養及び食品化学研究室において行った。

本研究の遂行および本論文の作成において、常に適切なる御指導と御助言を賜りました、東京大学名誉教授・日本獣医畜産大学教授・理化学研究所国際フロンティア研究システムフローラ研究チームリーダー 光岡知足先生、ならびに千葉大学名誉教授 綾野雄幸先生に深謝いたします。

同時に、本論文の御校閲を戴きました東京大学農学部獣医公衆衛生学教室教授 高橋英司先生に厚く御礼申し上げます。

また、数々の御助言・御討論をいただきました理化学研究所 鈴木邦夫、辨野義己、伊藤喜久治、水谷武夫博士、早稲田大学教授太田富貴雄先生、各実験における共同研究者の皆様、ならびに共に研究を行った研究室の皆様に感謝いたします。

本研究を行うにあたり、その機会を与えて下さいました日本食品化工株式会社 野田日吉社長、小松幹一、三輪泰造顧問、諏訪好孝専務、児嶋準一取締役、岡田実研究所長、丸山厚二所長補佐、ならびに竹内政保食品研究グループリーダー、川村三郎元リーダーに感謝いたします。

1. 1) Fowell, H.C.: *Trade Winds, History, Ecology and Atmosphericity*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
2. 2) Fowell, H.C.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
3. 3) Fowell, H.C., Montague, R.L.T., Webster, T.H., and Lewis, A.B.: *Geography, H.A. and Climate, H.A. History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
4. 4) Montague, R.L. and Webster, T.H.: *The Atmospheric Contribution to the Heat and Moisture Budget of the Earth*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
5. 5) Fowell, H.C.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
6. 6) Webster, T.H.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
7. 7) Webster, T.H.: *The Effects of Wind, Humidity and Heat on the Human Body*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
8. 8) Webster, T.H. and Montague, R.L.T.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
9. 9) Webster, T.H.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
10. 10) Webster, T.H.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
11. 11) Webster, T.H.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
12. 12) Webster, T.H.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).
13. 13) Webster, T.H.: *Atmospheric Heat, Humidity and History*. *Atmosphere*, 10, 122 (1957).

参 考 文 献

- (1) Trowell, H.C.: Crude Fiber, Dietary Fiber and Atherosclerosis, Atherosclerosis, **16**, 138 (1972).
- (2) Trowell, H.C.: Ischemic Heart Disease and Dietary Fiber, Am. J. Clin. Nutr., **25**, 926 (1972).
- (3) Trowell, H.C., Southgate, D.A.T., Wolever, T.M.S., Leeds, A.R., Gassull, M.A. and Jenkins, D.J.A.: Dietary Fiber Redefined, Lancet, **1**, 967 (1976).
- (4) McCance, R.A. and Lawrence, R.D.: The Carbohydrate Content of Food, Med. Res. Coun. Spec. Rept. Ser., **135**, 24 (1923).
- (5) Trowell, H.C.: Non-Infective Disease in Africa, pp.217, Edward Arnold, London (1960).
- (6) Burkitt, D.P.: Epidemiology of Cancer of the Colon and Rectum, Cancer, **28**, 3 (1971).
- (7) Walker, A.R.P.: The Effects of Recent Changes of Food Habits and Bowel Motility, S. Afr. Med. J., **21**, 590 (1947).
- (8) Walker, A.R.P. and Arvidsson, U.B.: Fat Intake, Serum Cholesterol Concentration, and Atherosclerosis in the South Africa Bantu. 1. Low-Fat Intake and the Age Trend of Serum Cholesterol Concentration in the South African Bantu, J. Clin. Invest., **33**, 1358 (1954).
- (9) Cleave, T.L.: The Neglect of Natural Principles in Current Medical Practice, J. Roy. Nav. Med. Serv., **42**, 55 (1956).
- (10) Malhotra, S.L.: Geographical distribution of gastrointestinal cancers with special reference to causation. Gut, **8**, 361 (1967).
- (11) Kellogg, J.H.: The New Dietetics; a Guide to the Scientific Feeding in Health and Disease, Battle Creek (1923).
- (12) Cowgill, G.R. and Sullivan, A.J.: Further Studies on the Use of Wheat Bran as a Laxative, J. Am. Med. Assoc., **100**, 795 (1933).

- (13) Dimock, E.M.: The Prevention of Constipation, Brit. Med. J., **1**, 906 (1937).
- (14) Brodribb, A.J.M. and Humphreys, D.M.: Diverticular Disease; Three Studies. Part 1. Relation to Other Disorders and Fiber Intake, Brit. Med. J., **1**, 424 (1976).
- (15) Ershoff, B.H.: Protective Effects of Alfalfa in Immature Mice Fed Toxic Doses of Glucoascorbic Acid, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **87**, 134 (1954).
- (16) Tanaka, Y. and Skoryna, S.C.: Application of Algal Polysaccharides as in vivo Binders of Metal Pollutants, pp.131, 7th International Seaweed Symposium, Abstracts (1971).
- (17) Ershoff, B.H.: Beneficial Effects of Alfalfa Meal and Other Bulk-Containing or Bulk-Forming Materials on the Toxicity of Non-Ionic Surface Active Agents in the Rat, J. Nutr., **70**, 484 (1960).
- (18) Takeda, H. and Kiriyaama, S.: Correlation between the Physical Properties of Dietary Fibers and Their Protective Activity against Amaranth Toxicity in Rats, J. Nutr., **109**, 388 (1979).
- (19) Barbolt, T.A. and Abraham, R.: The Effect of Bran on Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinogenesis in the Rat, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **157**, 656 (1978).
- (20) 桐山修八: 食物センイの栄養学的効果, 化学と生物, **18**, 95 (1980).
- (21) Lin, T.M., Kim, K.S., Karvinen, E. and Ivy, A.C.: Effect of Dietary Pectin, Protopectin and Gum Arabic on Cholesterol Excretion in Rats, Am. J. Phys., **188**, 66 (1957).
- (22) Keys, A., Granda, F. and Anderson, J.T.: Fiber and Pectin in the Diet and Serum Cholesterol Concentration in Men, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **106**, 555 (1961).
- (23) Jenkins, D.J.A., Leeds, A.R., Wolever, T.M.S., Goff,

- D.V., Alberti, K.G.M.M., Gassull, M.A. and Hockaday, T.D.R.: Unabsorbable Carbohydrates and Diabetes; Decreased Post-Prandial Hyperglycaemia, Lancet, **2**, 172 (1976).
- (24) Anderson, J.W.: High Polysaccharide Diet Studies in Patients with Diabetes and Vascular Disease, Cereal Food World, **22**, 12 (1977).
- (25) 鈴木和枝, 池田義雄: 糖尿病, 肥満と食物繊維, 臨床栄養, **57**, 615 (1979).
- (26) Mirande, P.M. and Horwitz, D.L.: High Fiber Diets in the Treatment of Diabetes Mellitus, Ann. Int. Med., **88**, 482 (1978).
- (27) Munoz, L.M., Sandstead, H.H., and Jacob, R.A.: Effects of Dietary Fiber on Glucose Tolerance of Normal Men, Diabetes, **28**, 496 (1979).
- (28) Morgan, L.M., Goulder, T.J., Tsiolakis, D., Marks, V. and Alberti, K.G.M.M.: The Effect of Unabsorbable Carbohydrate on Gut Hormones, Diabetologia, **17**, 85 (1979).
- (29) Mitsuoka, T.: Intestinal Bacteria and Health, Harcourt Brace Jovanovich Japan, Tokyo (1990).
- (30) 光岡知足: 腸内菌叢の分類と生態, pp.159, (財) 食生活研究会, 東京 (1986).
- (31) 鈴木邦夫, 光岡知足, 吉武豊, 児玉義勝: ストレスと腸内フローラ, 腸内フローラと生体防衛 (光岡知足編), pp.47, 学会出版センター, 東京 (1982).
- (32) Fuchs, H.-M., Dorfman, S. and Floch, M.H.: The Effect of Dietary Fiber Supplementation in Man. 2. Alteration in Fecal Physiology and Bacterial Flora, Am. J. Clin. Nutr., **29**, 1443 (1976).
- (33) Drasar, B.S., Jenkins, D.J.A. and Cummings, J.H.: The Influence of a Diet Rich in Wheat Fiber on the Human Faecal Flora, J. Med. Microbiol., **9**, 423 (1976).
- (34) Baird, I.M., Walters, R.L., Davies, P.S., Hill, M.J.,

- Drasar, B.S. and Southgate, D.A.T.: The Effects of Two Dietary Fiber Supplementations on Gastrointestinal Transit, Stool Weight and Frequency, and Bacterial Flora, and Fecal Bile Acids in Normal Subjects, Metabolism, **26**, 117 (1977).
- (35) Moore, W.E.C., Cato, E.P. and Holdeman, L.V.: Anaerobic Bacteria of the Gastrointestinal Flora and Their Occurrence in Clinical Infections, J. Infect. Dis., **119**, 641 (1969).
- (36) Reddy, B.S., Weisburger, J.H. and Wynder, E.L.: Effects of High Risk and Low Risk Diets for Colon Carcinogenesis on Fecal Microflora and Steroids in Man, J. Nutr., **105**, 878 (1975).
- (37) Finegold, S.M., Attebery, H.R. and Sutter, V.L.: Effect of diet on Human Fecal Flora; Comparison of Japanese and American Diets, Am. J. Clin. Nutr., **27**, 1456 (1974).
- (38) Hill, M.J., Crowther, J.S., Drasar, B.S., Howksworth, G., Aries, V. and Williams, R.E.O.: Bacteria and Aetiology of Cancer of the Large Bowel, Lancet, **1**, 95 (1971).
- (39) Aries V.C., Crowther, J.S., Drasar, B.S., Hill, M.J. and Ellis, F.R.: The Effect of a Strict Vegetarian Diet on the Faecal Flora and Faecal Steroid Concentration, J. Path., **103**, 54 (1970).
- (40) Benno, Y., Endo, K., Mizutani, T., Namba, Y., Komori, T. and Mitsuoka, T.: Comparison of Microflora of Elderly Persons in Rural and Urban Areas of Japan, Appl. Environ. Microbiol., **55**, 1100 (1989).
- (41) 米山勝, 岡田勝秀, 万代隆彦, 阿賀創, 境修造, 市川富雄: ヒトにおける水溶性多糖プルランの影響, 澱粉科学, **37**, 123 (1990).
- (42) 辨野義己, 遠藤希三子, 白神伸江, 光岡知足: ヒト腸内フローラおよび糞便性状におよぼすビフィズス菌末およびフラクトオリゴ糖添加プラントゴオバータ (*Plantago ovata*) の効果, ビフ

- イズス, 1, 39 (1987).
- (43) 辨野義己, 光岡知足: 発癌因子としての腸内フローラーヒトの腸内フローラに及ぼす食餌成分の影響, 腸内フローラと成人病, pp.29, 学会出版センター, 東京 (1985).
 - (44) 遠藤希三子, 久米村恵, 菅原正義, 田代靖人, 中村華月, 鈴木邦彦, 藤沢倫彦, 白神伸江, 鈴木邦夫, 光岡知足: 動物性脂肪および食物繊維の腸内フローラならびに宿主の代謝に及ぼす影響, 腸内細菌と生態ホメオスタシス, pp.31, (財)学会出版センター, 東京 (1989).
 - (45) 野田日吉, 三輪泰造: コーンスターチ, 澱粉科学ハンドブック pp.299, 朝倉書店, 東京 (1977).
 - (46) 竹内政保, 菅原正義, 川村三郎: トウモロコシ由来の食物繊維について, 澱粉科学, 37, 115 (1990).
 - (47) 綾野雄幸, 太田富貴雄, 渡辺幸雄, 中村強, 滝沢まゆみ: ラットのコレステロール代謝に及ぼすトウモロコシ外皮の影響, 栄養と食糧, 35, 431 (1982).
 - (48) Story, J.A. and Kritchevsky: Dietary Fiber and Lipid Metabolism, Fiber in Human Nutrition (Spiller, G.A. and Amen, R.J. ed.), pp.180, Plenum Press, New York (1976).
 - (49) Takeuchi, M., Hara, M., Inoue, T. and Kada, T.: Adsorption of Mutagens by Refined Corn Bran, Mutation Res., 204, 263 (1988).
 - (50) Morotomi, M. and Mutai, M.: In Vitro Binding of Potent Mutagenic Pyrolyzates to Intestinal Bacteria, JNCI, 77, 195 (1986).
 - (51) 菅原正義: コーンブランヘミセルローズ標品のラットコレステロール代謝に及ぼす影響, 千葉大学園芸学部卒業論文 (1984).
 - (52) 内田清久: 胆汁酸の代謝回転, 代謝, 10, 1090 (1973).
 - (53) 平山雄: 予防ガン学1980, 新宿書房, 東京 (1980).
 - (54) 光岡知足, 食生活と腸内細菌と発癌, Oncologia, 1, 102 (1982).
 - (55) 渡辺嘉久, 池田義雄: 便秘, 食物繊維, pp.318, 第一出版株式会社, 東京 (1982).
 - (56) 永原太郎, 岩尾裕之, 久保彰治: 食品分析法, 柴田書店, 東京

- (1964).
- (57) Van Soest, P.J.: Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 1. Preparation of fiber residue of low nitrogen content, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **46**, 825 (1963).
 - (58) Van Soest, P.J.: Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **46**, 825 (1963).
 - (59) 奥恒行, 小西史子, 細谷憲政: ラットの生理機能におよぼす難消化性多糖類の性状ならびに飼育期間の影響, 栄養と食糧, **34**, 437 (1981).
 - (60) Eastwood, M.A., Kirkpatrick, J.R., Mitchell, W.D., Bone, A. and Hamilton, T.: Effect of Dietary Supplements of Wheat Bran and Cellulose on Faeces and Bowel Function, Br. Med. J., **4**, 392 (1973).
 - (61) Spiller, G.A., Chernoff, M.C., Hill, R.A., Gates, J.E., Nassar, J.J. and Shipley, E.A.: Effect of Transit Time, Fecal Weight and Volatile Fatty Acids of Purified Cellulose, Pectin and Low Residue Diets in Human, Fed. Proc., **37**, 755 (1978).
 - (62) Mallett, A.K., Rowland, I.R. and Bearn, C.A.: Influence of Wheat Bran on Some Reductive and Hydrolytic Activities of Rat Cecal Flora, Nutr. Cancer, **8**, 125 (1986).
 - (63) Goldin B.R., Dwyer, J., Gorbach, S.L., Gordon W. and Swenson, L.: Effect of Diet and Lactobacillus Acidophilus Supplements on Human Fecal Bacterial Enzymes, Am. J. Clin. Nutr., **31**, S136 (1978).
 - (64) Rowland, I.R. and Mallett, A.K.: Dietary fiber, and the gut microflora--their effects on toxicity, New Concepts and Developments in Toxicology (Chambers, P.L. Gehring, P., and Sakai, F. eds.), pp.125, Elsevier Science Publishers, London (1986).

- (65) 京都大学医学部医の倫理委員会訳: DECLARATION OF HELSINKI (1964) (1975修正), 日本栄養・食糧学会誌, **44**, 75 (1991).
- (66) Prosky, Y.L., Asp, N.G., Furda, I., Devries, J.W., Schweizer, T.F. and Harland, B.F.: Determination of total dietary fiber in foods, food products, and total diets: Interlaboratory study, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **67**, 1044 (1984).
- (67) 光岡知足: 腸内菌の世界, 叢文社, 東京 (1980).
- (68) Goldin, B.R. and Gorbach, S.L.: The Relationship Between Diet and Rat Fecal Bacterial Enzymes Implicated in Colon Cancer, J. Natl. Cancer. Inst., **57**, 371 (1976).
- (69) 奥恒行: 便容積の増加, 食物繊維, pp.89, 第一出版株式会社, 東京 (1982)
- (70) 竹内政保, 川村三郎, 菅原正義, 鈴木陽子, 葩花雄, 尾形ひろ美, 太田富貴雄, 綾野雄幸: 精製トウモロコシ外皮 (RCB) がラットの滞腸時間に及ぼす影響ならびにRCB添加ビスケットの人における便秘改善効果について, 栄養学雑誌, **45**, 165 (1987).
- (71) Slavin, J.L. and Marlett, J.A.: Effect of Refined Cellulose on Apparent Energy, Fat and Nitrogen Digestibilities, J. Nutr., **110**, 2020 (1980).
- (72) Kies, C.: Unconventional Sources of Dietary Fiber (Comstock, M.J. ed.), pp.61, The American Chemical Society, Washington D.C. (1983).
- (73) Williams, R.D. and Olmsted, W.H.: The Effect of Cellulose, Hemicellulose and Lignin on the Stool; a Contribution of Laxation in Men, J. Nutr., **11**, 433 (1936).
- (74) Olson, A.C., Gray, G.M., Chou, M. and Fleming, S.E.: Unconventional Sources of Dietary Fiber (Comstock, M.J. ed.), pp.221, The American Chemical Society, Washington D.C. (1983).
- (75) 竹内政保, 川村三郎, 田中進, 太田富貴雄, 綾野雄幸: 精製トウモロコシ外皮 (RCB) のラットの成長および消化率に及ぼ

- す影響と消化管での形態変化，日本栄養・食糧学会誌，**41**，35 (1988)。
- (76) Rowland, I.R. and Wise, A.: The Effect of Diet on the Mammalian Gut Flora and Its Metabolic Activities, CRC Critiinal Reviews in Toxicology, **16**, 31 (1985).
 - (77) Correa, P. and Haenszel, W.: Advances in Cancer Research (Klein, G. and Weinhouse, S. eds.), pp.471, Academic Press., New York (1978).
 - (78) Phillips, R.L. and Snowdon, D.A.: Dietary relationships with fatal colorectal cancer among Seventh-day Adventists, JNCI, **74**, 307 (1985).
 - (79) Doll, R., Muir, C. and Waterhouse, J. (eds.): Cancer Incidence in Five Continents, Vol. 2, Intl. Union Against Cancer, Springer Verlag, New York (1970).
 - (80) Benno, Y., Suzuki, K., Suzuki, K., Narisawa, K., Bruce, W.R. and Mitsuoka, T.: Comparison of the Fecal Microflora in Rural Japanese and Urban Canadians, Microbiol Immunol., **30**, 521 (1986).
 - (81) Reddy, B.S., Sharma, C., Mathews, L., Engle, A., Laakso, K., Choi, K., Puska, P. and Korpella, R.: Metabolic epidemiology of colon cancer: fecal mutagens in healthy subjects from rural Kuopio and urban Helsinki, Finland, Mutat. Res., **152**, 97 (1985).
 - (82) Wise, A., Mallett, A.K. and Rowland I.R.: Dietary fiber, bacterial metabolism and nitrate in rat, Xenobiotica, **12**, 111 (1982).
 - (83) Rowland, I.R., Wise, A. and Mallett, A.K.: Metabolic profile of caecal microorganisms from rats fed indigestible plant cell-wall components, Food. Chem. Toxicol., **21**, 25 (1983).
 - (84) Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro, Y.: Effect of fractooligosaccharides on intestinal flora and human health, Bifidobacteria Microflora, **5**, 37 (1986).

- (85) Yoshida, H., Nakajima, T., Ueno, Y., Kolke, N., Onda, M., Ohe, K. and Miyoshi, A.: A simple and rapid screening method of amino acids and amines in biological samples, Hiroshima J. Med. Sci., **27**, 85 (1978).
- (86) Heddle, J.A., Blakey, D.H., Duncan, A.M.W., Goldberg, M.T., Newmark, H., Wargovich, M.J. and Bruce, B.A.: Indicators of Genotoxic Exposure (Bridges, B.A., Butterworth, B.E. and Weinstein, I.B.), pp.367, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982).
- (87) Suzuki, K. and Bruce W.R.: Human fecal fractions can produce nuclear damage in the colonic epithelial cells of mice, Mutat. Res., **141**, 35 (1984).
- (88) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Metods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonera/mammalian-microsome mutagenecity test, Mutat. Res., **31**, 347 (1975).
- (89) Spatz, M., Smith, D.W.E., McDaniel, E.G., and Laqueur, G.L.: Role of intestinal microorganisms in determining cycasin toxicity, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **124**, 691 (1967).
- (90) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A., and Ames, B.N.: Fecalase: a model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **77**, 4961 (1980).
- (91) Brown, J.P. and Dietrich, P.S.: Mutagenicity of plant flavonols in the Salmonella/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources, Mut. Res., **66**, 223 (1979).
- (92) Nagao, M., Morita, N., Yahagi, T., Shimizu, M., Kuroyanagi, M., Fukuota, M., Yoshihira, K., Natori, S., Fujino, T., and Sugimura, T.: Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds, Environ. Mutagenesis, **3**, 401 (1981).

- (93) Brown, J.P., Chung, K.-H., and Andrewa, A.W.: Mutagenic activity of tryptophan metabolites produced by rat intestinal microflora, J. Natl. Cancer Inst., **57**, 921 (1976).
- (94) 白幡 晶: ポリアミンの生理的役割の探索, 生物と化学, **28**, 162 (1990).
- (95) 奥恒行: 無機質, 食物繊維, pp.113, 第一出版株式会社, 東京 (1982).
- (96) 菊永茂司, 有森三和子, 高橋正侑: ラットにおけるミネラルの利用能におよぼす飼料中フィチン酸塩の影響, 日本栄養・食糧学会誌, **37**, 77 (1984).
- (97) Southgate, D.A.T.: Determination of Carbohydrates in Food. 2. Unavailable Carbohydrates, J. Sci. Food Agric., **20**, 331 (1969).
- (98) Okuda, H. and Fujii, S.: Direct colorimetric assay of blood ammonia, Medicine Today, **21**, 622 (1966).
- (99) 小石秀夫, 田中武彦, 奥田拓道編: エネルギー代謝と栄養, 光生館, 東京 (1991).
- (100) 上代淑人監約: ハーバー・生化学 第19版, 丸善, 東京 (1984).
- (101) 岡田勝秀, 米山勝, 万代隆彦, 阿賀創, 境修造, 市川富夫: プルランの消化性と発酵性, 日本栄養・食糧学会誌, **1**, 43 (1990).
- (102) 矢島高二: 腸管機能に及ぼす短鎖脂肪酸の生理作用, 腸内フローラと生体ホメオスタシス (光岡知足編), 学会出版センター, 東京 (1989).
- (103) 日高秀昌, 原哲郎, 栄田利章, 岡田淳, 島田薫, 光岡知足: フラクトオリゴ糖の腸内フローラに及ぼす影響, 腸内フローラと食物因子 (光岡知足編), pp.39, 学会出版センター, 東京 (1984).
- (104) Komoto, T., Fukui, S., Takahisa, H., Machida, Y., Arai, M. and Mitsuoka, T.: Effect of Isomalto-oligosaccharides on Human Fecal Flora, Bifidobacteria Microflora, **7**, 61 (1988).

- (105) 菅原正義, 竹内政保, 中久喜輝夫, 光岡知足: マルトテトラオース(G 3)含有シラップのヒト腸内フローラに及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会誌, **42**, 123 (1989).
- (106) Sugawara, N.: The intestinal microflora of cirrhotic patients and its changes after oral administration of latamoxef in combination with drag-resistant *Bifidobacterium longum*, Abstracts of "International Bifidobacterium Conference (Tokyo, 1990)", pp.36.
- (107) Somogyi, M.: Notes on Sugar Determination. J. Biol. Chem., **195**, 19 (1952).
- (108) Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol. Chem., **153**, 375 (1944).
- (109) 木幡陽: 糖質・濾紙クロマトグラフィー, 生化学データブック 1, pp.415, 東京化学同人, 東京 (1979).
- (110) 武藤泰敏: 消化・吸収, 第一出版株式会社 (1988).
- (111) Eastwood, M.A.: Abstract of "Gastrointestinal effects of dietary fiber, Kellogg International Symposium on Dietary Fiber (Tokyo, 1989)", pp.18.
- (112) 綾野雄幸: 食物繊維の化学, 食物繊維, pp.17, 第一出版株式会社, 東京 (1982).
- (113) 青江誠一郎, 太田富貴雄, 綾野雄幸: ラットの腸内細菌叢に及ぼす水溶性食物繊維の影響, 日本栄養・食糧学会誌, **41**, 203 (1988).
- (114) 田中敬一, 永谷隆編: 図説走査電子顕微鏡, 朝倉書店 (1980).
- (115) 武田秀敏, 桐山修八: 食物繊維の物理化学的性質, 食物繊維, pp.57, 第一出版株式会社, 東京 (1982).
- (116) Eastwood, M.A.: 食物繊維, 最新栄養学 (小原哲二郎, 木村修一監約), pp.127, 建帛社, 東京 (1987).
- (117) 矢沢幸平, 南善宏, 田中善蔵: ビフィズス菌に選択的に利用される糖源の検索, 腸内フローラと食物因子, pp.15, 学会出版センター, 東京 (1984).
- (118) 海老原清, 平尾昭彦, 桐山修八: 植物性難消化性成分(Dietary Fiber)のコレステロール低下作用とタウロコール酸結合能: 日

本農芸化学会誌, 52, 401 (1978).

- (119) Truswell, A.S.: Food Fibre and Blood Lipids, Nutr. Rev.,
35, 51 (1977).

1 EG agar (継代用)

EG寒天培地 (栄研)	40.7 g
蒸留水	1000 ml
馬脱纖維血液	50 ml

2 EG agar (菌叢解析用)

馬肉抽出液	465 ml
フロイデオール No.3 (Difco)	10 g
イーストエキストラクト (Difco)	5 g
Na_2HPO_4	2 g
ブドウ糖	1.5 g
可溶性フェノール	0.5 g
レシチン	0.2 g
トレスリコン SH5535 10% soln.	5 ml
Tween 80	0.5 g
寒天 (Difco)	18 g
レスチン・HCl・ H_2O	0.5 g
馬脱纖維血液	50 ml
蒸留水	465 ml

※ 馬肉抽出液の調製

馬挽肉 (赤身がよい)	5 kg
蒸留水	5 l

3 BL agar

BL寒天培地 (栄研)	60 g
蒸留水	1000 ml
馬脱纖維血液	50 ml

4 TS agar

トリプチンスライカー (BBL)	40 g
蒸留水	1000 ml
馬脱纖維血液	50 ml

5 BS agar

BL寒天培地 (栄研)	60 g
BS添加液	20 ml
フ ^o ロヒ ^o オン酸ナトリウム	15 g
蒸留水	1000 ml
馬脱纖維血液	50 ml

※ BS添加液の調製

硫酸ハ ^o ロモイシン (協和醗酵)	250 ml
硫酸フラシ ^o オマイシン (日本化薬)	1000 mg
塩化リチウム	15 g
滅菌水	100 ml

6 ES agar

EG寒天培地 (栄研)	40.7 g
ES添加液	20 ml
フ ^o ロヒ ^o オン酸ナトリウム	15 ml
蒸留水	1000 ml
馬脱纖維血液	50 ml

※ ES添加液の調製

硫酸フラシ ^o オマイシン	1000 ml
コリマイシン (科研薬化工)	50 mg
硫酸ストレフ ^o トマイシン (明治)	2.5 g
滅菌水	100 ml

7 NBGT agar

EG寒天培地 (栄研)	40.7 g
蒸留水	1000 ml
NBGT添加液	20 ml
馬脱纖維血液	50 ml

※ NBGT添加液の調製

タウロコ ^o ル酸ナトリウム	5.0 g
フ ^o リリアント緑 (Merck) 0.1% soln.	5.0 ml
硫酸フラシ ^o オマイシン	1.0 g

NaOH 10% soln.

滅菌水 100mℓ

8 VS agar

トリプチン (BBL) 5 g

イーストエキストラクト (Difco) 3 g

チオクワリコル酸ナトリウム 0.75 g

フクリアント緑 (Merck) 0.1% soln. 1mℓ

Tween 80 1 g

乳酸ナトリウム (50% soln.) 25mℓ

寒天 (Difco) 15 g

オレアントマイシン 1% soln. 3mℓ

馬脱纖維血液 50mℓ

蒸留水 1000mℓ

9 NN agar

ペプトン (Difco) 40 g

Na_2HPO_4 5 g

KH_2PO_4 1 g

NaCl 2 g

MgSO_4 0.1 g

ブドウ糖 2 g

寒天 (Difco) 25 g

蒸留水 1000mℓ

卵黄液 (50%) 100mℓ

硫酸フラスコマイシン 2% soln. 10mℓ

※ 卵黄液の調製

鶏卵 約3個

生理的食塩水 (滅菌済み) 100mℓ

10 LBS agar

LBS寒天培地 (BBL) 84 g

ブレイムコハクサール (Oxoid) 8 g

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	15 g
蒸留水	1000 ml
氷酢酸	3.7 ml

1 1 DHL agar

DHL寒天培地 (栄研)	45 g
蒸留水	1000 ml

1 2 TATAC agar

ペプトン (Difco)	15 g
トリプトン (Difco)	10 g
イーストエキストラクト (Difco)	10 g
ショ糖	1 g
エスクリン (Merck)	1 g
寒天 (Difco)	16 g
蒸留水	1000 ml
馬血清 (Gibco)	50 ml
TATAC添加液 I	22 ml
TATAC添加液 II	20 ml

※ TATAC添加液 I の調製

窒化ナトリウム	0.45 g
グルタミン酸ナトリウム	30 g
滅菌水	100 ml

※ TATAC添加液 II の調製

アクリンソレシチン (Merck)	0.01 g
塩化トリフェニルテトラリウム	0.1 g
クリスタル紫 (Merck)	6.5 mg
硫酸タリウム	1.65 g
滅菌水	100 ml

1 3 P agar

ペプトンエキストロス寒天培地 (Difco)	39 g
蒸留水	1000 ml

酒石酸 10% soln.	14mℓ
---------------	------

1 4 P E E S agar

スタビロコッカス No.110寒天培地 (栄研)	145 g
塩化リチウム	5 g
フェニル・エチルアルコール	2.5mℓ
蒸留水	1000mℓ
卵黄液 (50%)	20mℓ

1 5 M-10 agar (Plate in bottle 法用)

トリプチナス (BBL)	2 g
イーストエキストラクト (Difco)	0.5 g
ヘミン (0.2%NaOHに0.1%溶解)	1mℓ
VFA混合液	3.1mℓ
ブドウ糖	0.5 g
セロビオース	0.5 g
可溶性デンプン (Merck)	0.5 g
塩類溶液 I	37.5mℓ
塩類溶液 II	37.5mℓ
レオスリン 0.1% soln.	0.5mℓ
トレ・シリコン SH5535 10% soln.	5mℓ
L-システイン・HCl・H ₂ O 5% soln.	10mℓ
L-アスコルビン酸 25% 注射用	2mℓ
寒天 (Difco)	18 g
Na ₂ CO ₃	4 g
蒸留水	850mℓ

※ VFA混合液の調製

酢酸	17mℓ
プロピオン酸	6mℓ
n-酪酸	4mℓ
イ酪酸	1mℓ
n-吉草酸	1mℓ
イ吉草酸	1mℓ

DL- α -メチル酪酸	1 ml
※ 塩類溶液 I の調製	
K_2HPO_4	3.9 g
蒸留水	500 ml
※ 塩類溶液 II の調製	
KH_2PO_4	2.35 g
NaCl	5.9 g
$(NH_4)_2SO_4$	6 g
$CaCl_2$	0.6 g
$MgSO_4 \cdot H_2O$	1.25 g
蒸留水	500 ml

16 EGLFスラント (菌株保存用)

ラフ・レムコハ [®] ・ウダー (Oxid)	2.1 g
フ [®] ・ロチオー・スハ [®] ・フトン No.3 (Difco)	10 g
イーストエキストラクト (Difco)	5 g
Na_2HPO_4	4 g
フト [®] ・ウ糖	1 g
可溶性 [®] ・ソフ [®] ・ソ (Merck)	0.5 g
レ [®] ・シスチン \cdot 2HCl (EG plate を参照)	0.2 g
ト [®] ・レシリコンSH5535 10% soln.	5 ml
Fildes soln. (消化血液)	40 ml
レ [®] ・サス [®] ・リン 0.1% soln.	1 ml
肝臓エキス	35-40 ml
寒天 (Difco)	17 g
Na_2CO_3	4 g
レ [®] ・システイン \cdot HCl	0.5 g
レ [®] ・アスコルビン酸 25%注射用	2 ml
蒸留水	1000 ml

※ Fildes soln. (消化血液) の調製

生理的食塩水	150 ml
HCl conc	6 ml
馬血液	50 ml

ヘ ⁺ フ ⁺ シ ⁺ (Difco)	10000U
NaOH 20% soln.	12mℓ
クロロホルム	2mℓ

※ 肝臓エキスの調製

肝臓末 (極東)	10 g
蒸留水	170 mℓ

17 EGF broth (増菌用)

ラ ⁺ フ ⁺ レ ⁺ ムコ ⁺ ハ ⁺ ウ ⁺ タ ⁺ ー (Oxoid)	2.4 g
フ ⁺ ロ ⁺ テ ⁺ オ ⁺ ス ⁺ ヘ ⁺ フ ⁺ ト ⁺ ン No.3 (Difco)	10 g
イ ⁺ ース ⁺ ト ⁺ エ ⁺ キ ⁺ ス ⁺ トラ ⁺ クト (Difco)	5 g
Na ₂ HPO ₄	4 g
Fildes soln.	40mℓ
フ ⁺ ト ⁺ ウ ⁺ 糖	5 g
可 ⁺ 溶 ⁺ 性 ⁺ テ ⁺ ソ ⁺ フ ⁺ ソ ⁺ ン (Merck)	0.5 g
レ ⁺ ・ス ⁺ ス ⁺ テ ⁺ イ ⁺ ン・HCl・H ₂ O	0.5 g
蒸留水	960mℓ
Tween 80	少量

18 PYF broth (糖分解試験用)

トリ ⁺ フ ⁺ チ ⁺ ケ ⁺ ス ⁺ ヘ ⁺ フ ⁺ ト ⁺ ン (BBL)	10 g
イ ⁺ ース ⁺ ト ⁺ エ ⁺ キ ⁺ ス ⁺ トラ ⁺ クト (Difco)	5 g
Fildes soln.	40mℓ
塩溶液	40mℓ
レ ⁺ ・ス ⁺ ス ⁺ テ ⁺ イ ⁺ ン・HCl・H ₂ O	0.5 g
蒸留水	920mℓ

※ 塩溶液の調製

CaCl ₂ (anhydrous)	0.2 g
MgSO ₄	0.2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaHCO ₃	10 g
NaCl	2 g

蒸留水

1000 ml

19 希釈液 B (菌叢解析サンプル希釈用)

塩類溶液 I

37.5 ml

塩類溶液 II

37.5 ml

レオスリン 0.1% soln.

0.7 ml

寒天 (Difco)

0.5 g

L-システイン・HCl・H₂O

0.5 g

L-アスコルビン酸 25%注射用

2 ml

Na₂CO₃

4 g

蒸留水

960 ml

