ラットおよびヒトにおけるセロオリゴ糖の消化吸収性 および生体に及ぼす影響

里内 美津子*, 渡辺 隆司**, 若林 茂*
大隈 一裕*, 越島 哲夫***, 桑原 正章**

* 松谷化学工業株式会社研究所

** 京都大学木質科学研究所

*** 近畿大学農学部

Digestibility, Absorptivity and Physiological Effects of Cellooligosaccharides in Human and Rat

Mitsuko SATOUCHI,* Takashi WATANABE,** Shigeru WAKABAYASHI,*
Kazuyuki OHOKUMA,* Tetsuo KOSHIJIMA*** and Masaaki KUWAHARA**

* Research Institute, Matsutani Chemical Industry Co., Ltd., Itami 664

** Wood Research Institute, Kyoto University, Uji 611

*** Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 49, 143~148 (1996)

We produced cellooligosaccharides from cellulose with a membrane bioreactor, and studied their physiological functions. The results can be summarized as follows. (1) Although cellooligosaccharides were resistant to human salivary amylase, artificial gastric juice and porcine pancreatic amylase, they were partially hydrolyzed by rat intestinal mucosa cell homogenates. (2) The blood glucose level after cellooligosaccharide loading was gradually increased in rats. However, no increase in the blood glucose level was observed in humans. Insulin secretion was not stimulated by cellooligosaccharides in either rats or humans. (3) Excretion into feces after a single ingestion of cellooligosaccharides was not detected in rats. (4) The rats were kept for 4 weeks on a high-sucrose diet or a cellooligosaccharide-supplemented high-sucrose diet. At the 4th week, body fat, the serum level of fructosamine, total cholesterol and triglyceride were higher in the high-sucrose-fed rats than in the cellooligosaccharide-fed rats. These results suggest that cellooligosaccharides are indigestible saccharides, and that they would be expected to have beneficial effects on carbohydrate metabolism and prevention of diabetes and obesity.

Key Words cellooligosaccharides, indigestible saccharides, carbohydrate metabolism, diabetes, lipid metabolism.

(Received February 5, 1996)

食物繊維や難消化性のオリゴ糖は上部消化管での消化吸収を逃れて、下部消化管に達し、そこに生息する腸内細菌に利用される過程において生体にさまざまな生理的影響を及ぼすものと考えられている。近年、これら難消化性糖類が有する生理機能の有効利用に関する研究は、成人病予防を主眼として急速な進展をみせている。われわれは、難消化性多糖類（食物繊維）であるセルロースを原料にバイオリアクターを用いてセルロースを主成分

とするセロオリゴ糖を効率的に生産する方法を開発し報告したり。セロオリゴ糖は β -グルコシド結合を有することから難消化性糖類に分類されるものと考えられるが、セロオリゴ糖摂取後の生体に及ぼす影響に関する報告は、これまでその調製が容易でなかったことから散見するにすぎない²⁾³⁾。今回、セロオリゴ糖の生体に及ぼす影響について消化吸収ならびに糖質、脂質代謝の面から検討を加えた。

* 〒664 伊丹市北伊丹 5-3

** 〒611 宇治市五ヶ庄

*** 〒631 奈良市中町 3327-204

実験方法

1. 被験物質

今回の実験では、ポリスルホン製限外濾過膜、遠心分離器、反転式濾過ローターを備えた膜分離型バイオリアクターを作製し、*Trichoderma viride* 起源のセルラーゼを用いてサルファイトパルプを酵素分解し、限外濾過膜を通過した低分子画分を珪藻土およびイオン交換樹脂を用いて精製して得られたセロトリオース 3.5%, セロビオース 63.0% およびグルコース 33.0% から成るセロオリゴ糖 (以下 SE-63 と略す), SE-63 をエタノールおよびイソプロピルアルコールを用いて結晶化させて調製したセロトリオース 3.0%, セロビオース 93.1% およびグルコース 2.5% から成るセロオリゴ糖 (以下 SE-93 と略す), ならびにセロトリオース 3.7%, セロビオース 85.7% およびグルコース 9.3% から成るセロオリゴ糖 (以下 SE-86 と略す) を用いた。各セロオリゴ糖の収率は 60~75% であった。

2. 消化性試験 (in vitro)

岡田ら⁹⁾の方法に準じて、唾液アミラーゼ (Type IX-A, ヒト由来, ㈱シグマ社), 人工胃液 (塩酸-塩化カリウム液, pH 2.0), 膵アミラーゼ (ブタ由来, ベーリンガー・マンハイム山之内製薬㈱) ならびに小腸粘膜酵素 (ラット由来, ㈱シグマ社) を SE-63 およびマルチトール (㈱シグマ社, 純度約 98%) に作用させ、生じた還元糖あるいはグルコースを測定し消化性を評価した。

3. 単回投与試験 (ラット)

生後 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット (Jcl: SD, 日本クレア㈱) を固形飼料 (CE-2, 日本クレア㈱) で 1 週間予備飼育後, 単回投与試験に用いた。ラットを 16 時間絶食後, SE-93 を kg 体重当り 1.5 g 経口投与し, 固定器 (CFK 技術研究所) を用いて投与前, 30, 60 および 120 分後に無麻酔下で外頸静脈より採血し, 血糖値 (ムタローゼ GOD 法: 和光純薬㈱) ならびにインスリン分泌 (標準物質: ラット・インスリン, ビーズ固相 EIA 法: 和光純薬㈱) を測定した。マルトース (和光純薬㈱) についても同様の検討を行った。

4. 単回投与試験 (ヒト)

12 時間絶食した健康成人 6 名 (男子 5 名, 女子 1 名, 平均年齢 34.0 ± 1.3 歳) に 50 g の SE-93 を経口投与し, 投与前, 30, 60, 90 および 120 分後に肘静脈より採血し, 血糖値 (ムタローゼ GOD 法: 和光純薬㈱) ならびにインスリン分泌 (標準物質: ヒト・インスリン, ビーズ固相 EIA 法: 和光純薬㈱) を測定した。対照糖質として, マルトース (和光純薬㈱) を用いた。なお, 本試験はヘルシンキ宣言の趣旨を尊重して計画され, 松谷化学工業㈱倫理委員会の承認 (承認番号 95-02) を得て実施した。

5. 単回投与後の糞便への排泄率 (ラット)

生後 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット (Jcl: SD) を固形飼料 (SE-2) で 1 週間予備飼育後, 16 時間絶食させ, ゾンデを用いて体重 kg 当り 480 mg の SE-63 を胃内に投与し, 投与後 72 時間までの糞便を採取した。なお, SE-63 投与後は固形飼料を自由に摂取させた。採取した糞便については, 凍結乾燥後, 粉碎し, 水を加え, 超音波処理を行い, 遠心分離 ($1,000 \times g$, 10 分) 後の上澄みを, ジエチルエーテルで脱脂し, イオン交換樹脂に通液, 濃縮後, メンブランフィルターで濾過し, HPLC により糖の分析を行った (カラム: YMC-Pack Polyamine-II, キャリア: アセトニトリル 75%, 流速: 2.0 ml/min, 検出器: RI, カラム温度: 25°C)。この方法による検出限界は投与量に対して 4% であった。対照糖質として, マルチトール (㈱シグマ社) を用いた。

6. 連続投与試験 (ラット)

生後 3 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット (Jcl: SD, 日本クレア㈱) をショ糖 64.75%, カゼイン 25%, コーン油 5%, ミネラル混合 (MM-2⁹⁾) 4%, ビタミン混合 (Harper¹⁰⁾) 1%, 塩化コリン 0.2% およびビタミン E 0.05% からなる基本飼料⁷⁻⁹⁾ (以下高ショ糖食と略す) で 2 週間予備飼育後 4 群 (12 匹/群) に分け, I 群は高ショ糖食, II 群は高ショ糖食 99% に SE-86 を 1%, III 群は高ショ糖食 97.5% に SE-86 を 2.5%, IV 群は高ショ糖食 95.0% に難消化性デキストリン (以下 PF-C, 松谷化学工業㈱) を 5% 添加した飼料を与えた。飼料ならびに飲料水 (水道水) は自由に摂取させ, それぞれ 4 週間飼育した。なお, 飼料は 2 日ごとに交換し, その都度飼料摂取量を計測した。体重は 1 週間ごとに測定し, 試験開始時と 4 週目に体脂肪量を非破壊的小動物用体脂肪測定装置 (EM scan model SA-2: セントラル科学貿易) を用いて測定した。さらに, 試験開始 4 週目に採血 (朝 9:00 より 4 時間絶食後) し, 血清総コレステロール (T-cho: コレステロールオキシダーゼ法), HDL-コレステロール (HDL-cho: デキストラン硫酸-Mg²⁺ 液で分画後コレステロールオキシダーゼ法), トリグリセライド (TG: グリセロキナーゼグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ法), フルクトサミン (塩化ニトロブルー-テトラゾリウム法), 総タンパク (TP: ビュレット法), アルブミン (ビュレット法), GPT (POP・TOOS 法), アルカリフォスファターゼ (ALP: p-ニトロフェニルリン酸基質法), カルシウム (MXB 法) を診断用キット (フルクトサミンは BML, その他は和光純薬㈱) を用いて測定した。

試験終了後心臓への直接穿刺により脱血屠殺し, 肝臓, 腎臓, 盲腸を切離し, 重量を測定した。また, 精巢上体および腎臓周囲の脂肪組織の重量も併せて測定した。

7. 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差で表し、群間の有意差検定は Student の *t* 検定により行い、有意水準は5%とした。

実験結果

1. 消化性試験 (*in vitro*)

結果を Table 1 に示した。SE-63 ならびにマルチトールは、唾液アミラーゼ、胃液および膵臓アミラーゼにより加水分解されず、還元糖の生成を認めなかった。しかしながら、ラット小腸粘膜酵素によりグルコースの生成がみられた。

2. 単回投与試験 (ラット)

結果を Fig. 1 に示した。SE-93 の投与により血糖値の緩徐な上昇がみられたが、負荷後30分値はマルトース負荷に対し有意に低値であった。同様に、SE-93 負荷後30分のインスリン分泌はマルトース負荷に比べ有意に低値

Fig. 1. Changes in plasma glucose and insulin levels after the ingestion of maltose (○) or cellooligosaccharide (SE-93) (●) in rat.

Each point is the mean±SEM of 6 rats. The statistical comparisons were made between groups at same time (**p*<0.05).

であった。

3. 単回投与試験 (ヒト)

結果を Fig. 2 に示した。SE-93 を投与しても血糖値の

Table 1. Digestion of cellooligosaccharides (SE-63) and maltitol *in vitro* (%).

	SE-63	Maltitol
Salivary α -amylase ^{a1}	0.0	0.0
Artificial gastric juice ^a	0.0	0.0
Pancreatic α -amylase ^{a2}	0.0	0.0
Intestinal mucosa ^{b3}	6.3	4.8 ^c

^a Increment of reducing sugar measured by Somogi-Nelson method. ^b Increment of glucose measured by pyranose oxidase method. ^c Convert glucose into maltitol (1.00 mg glucose=1.91 mg maltitol).

¹ From human saliva. ² From porcine pancreas.

³ From rat intestine.

Fig. 2. Changes in plasma glucose and insulin levels after the ingestion of maltose (○) or cellooligosaccharide (SE-93) (●) in human.

Each point is the mean±SEM of 6 human. The statistical comparisons were made between groups at same time (**p*<0.05).

Table 2. The fecal density of various sugars after the ingestion of cellooligosaccharides (SE-63) or maltitol in rat.

Group	Sugar		
	Glucose (mg/g)	Cellobiose (mg/g)	Maltitol (mg/g)
Control	4.6±0.5	N.D.*	N.D.
SE-63	4.8±0.4	N.D.	N.D.
Maltitol	4.5±0.5	N.D.	N.D.

Values are mean±SEM of the sugar mg/g of dried feces. * N.D.: Not detected.

上昇はみられず、インスリンの追加分泌も認められなかった。

4. 単回投与後の糞便への排泄率（ラット）

結果を Table 2 に示した。SE-63 およびマルチトールは糞便中から検出されなかった。

5. 連続投与試験（ラット）

結果を Table 3 に示した。連続投与試験終了時（飼育 4 週後）の体脂肪率は SE-86 1%, および PF-C 5% 群において高シヨ糖食で飼育した対照群に比べ有意に低値で

あった。フルクトサミンは 3 群とも、対照群に比べ有意に低値であった。T-cho, HDL-cho および TG 値はすべての群で対照群に比べ低値であり、SE-86 2.5% 群の T-cho および PF-C 5% 群の HDL-cho 値以外は対照群との間に有意差が認められた。その他の血液生化学検査値については、GPT が SE-86 1% 群で有意に低値を示した以外はいずれの群も対照群との間に差異を認めなかった。体重、飼料効率および臓器重量については、PF-C 5% 群の盲腸重量が有意に高値を示した以外は差異を認めなかった。

考 察

本研究では、セルロースを酵素分解して調製したセロビオースを主成分とするセロオリゴ糖を用いて、まず *in vitro* において消化の程度を評価した。その結果、SE-63 (セロトリオース 3.5%, セロビオース 63.0% およびグルコース 33.0%) は、唾液アミラーゼ、胃液、膵臓アミラーゼによりまったく加水分解されなかったが、ラット小腸粘膜酵素により部分的に加水分解されることが明らかとなった。次に、グルコースをほとんど含まない SE-93 (セロトリオース 3.0%, セロビオース 93.1% およびグル

Table 3. Effect of cellooligosaccharides (SE-86) or indigestible dextrin (PF-C) supplement on body weight, feed efficiency, body fat, serum biochemical data, organ weight of rats at sacrifice after 4 weeks feeding of high-sucrose diet.

Number of rats	Control	SE-86 1%	SE-86 2.5%	PF-C 5%
	12	12	12	12
Body weight (g)	370±8	381±9	379±9	360±10
Feed efficiency ¹	0.35±0.01	0.35±0.02	0.34±0.01	0.33±0.01
Body fat (%)	30.0±1.1	27.3±0.8*	28.3±0.7	23.6±0.6*
Serum biochemical data				
fructosamine (μmol/l)	426±5	346±13*	344±15*	362±13*
T-cholesterol (mg/dl)	108.1±5.0	81.5±5.3*	91.6±3.4	89.9±3.3*
HDL-cholesterol (mg/dl)	83.2±4.5	53.7±3.3*	66.8±3.9*	72.3±4.3
Triglyceride (mg/dl)	88.0±4.8	63.6±6.3*	61.6±7.0*	56.0±6.0*
Total protein (g/dl)	6.0±0.1	6.2±0.2	6.0±0.1	5.7±0.2
Albumin (g/dl)	3.7±0.1	3.7±0.1	3.6±0.04	3.5±0.1
GPT (IU/l)	5.6±0.4	3.9±0.8*	4.4±0.8	4.8±0.3
ALP (IU/l)	67.5±4.2	79.0±12.0	77.5±5.6	77.1±4.5
Calcium (mg/dl)	8.6±0.2	9.0±0.2	9.3±0.2	8.8±0.2
Organs and fat pads (% of body weight)				
Liver	3.3±0.1	3.4±0.1	3.5±0.2	3.4±0.1
Kidney	0.7±0.02	0.7±0.02	0.7±0.02	0.7±0.01
Cecum with content	0.6±0.03	0.6±0.04	0.6±0.02	1.3±0.1*
Epididymal fat pads	1.7±0.1	1.6±0.1	1.6±0.1	1.4±0.1

Starting level of percent body fat: 21.7±0.3%; fructosamine: 213.1±11.1 μmol/l; T-cholesterol: 87.3±4.4 mg/dl; HDL-cholesterol: 52.3±2.8 mg/dl; triglyceride: 34.2±4.6 mg/dl. Values are mean±SEM. Statistically significant at * $p < 0.05$ levels when compared with the control. ¹ Four weeks feeding of high-sucrose diet.

コース 2.5%) を用いて単回投与試験を実施したところ、ラットでは緩徐な血糖値の上昇が認められたのに対し、ヒトではまったく血糖値の上昇は認められなかった。このラットとヒトにおける血糖応答の差異は、小腸粘膜におけるセロオリゴ糖の加水分解活性の違いに基づくものと予想され、その食事形態（調理法）の違いとも密接に関係しているものと思われる。注目すべきは、ヒトでは、SE-93 投与によっても血糖値の上昇ならびにインスリンの追加分泌がほとんど認められなかったことであり、セロオリゴ糖は糖尿病や肥満者用の低カロリー甘味料としての有用性が期待される。これらの結果は、セロオリゴ糖が上部消化管での消化吸収を逃れて大部分が下部消化管に到達していることを示唆するものである。一方、単回投与後のラットの糞便からは SE-63 は検出されず、下部消化管に到達したセロオリゴ糖は腸内細菌に利用された可能性が考えられた。腸内細菌が糖の分解により生成する短鎖脂肪酸は、エネルギー源としてのみならず、消化管粘膜血流量の増大、膵外分泌の刺激、消化管粘膜上皮細胞の増殖、消化管運動の刺激、ナトリウム・水分吸収の増大等の生理作用を有する¹⁰⁾との報告がある。また、短鎖脂肪酸のうちプロピオン酸は肝臓でのコレステロール合成を阻害するという報告¹¹⁾がある。そこで次に、ラットにセロオリゴ糖を連続投与し、血清脂質値や体脂肪蓄積に及ぼす影響を観察した。その結果、SE-86 1%および 2.5%群はいずれも、血清 T-cho 値が高シヨ糖食で飼育した対照群に比べ低値を示した。さらに、SE-86 1%および 2.5%群いずれも血糖のコントロール状態を反映すると考えられているフルクトサミン濃度が対照群に比べ有意に低値を示していた。また、体脂肪率も SE-86 群で低値を示した。シヨ糖の過剰摂取はラットに耐糖能障害¹²⁾や高脂血症¹³⁾¹⁴⁾、さらには肥満¹⁵⁾を誘起することが報告されており、今回の結果はセロオリゴ糖の連続摂取が高シヨ糖食条件下にみられるこれら糖質および脂質代謝の異常を軽減する上において一定の効果を有するものと考えられた。SE-86 の連続投与による糖質および脂質代謝改善の機序を推定することは、今回の試験結果のみでは困難であるが、二糖類のセロビオースを主成分とするオリゴ糖である SE-86 が、高粘性の水溶性食物繊維のように糖質や脂質の吸収を阻害する^{16)~18)}とは考えにくく、むしろ、セロオリゴ糖の連続摂取により腸内細菌叢が変化し、腸内発酵の主要な生成物である短鎖脂肪酸が糖質と脂質の代謝に慢性的な影響を及ぼした可能性が考えられる。今後、セロオリゴ糖の発酵性や菌叢の変化等を含めさらに検討を積み重ねていきたい。

SE-86 の連続投与群の体重、飼料効率、臓器重量は対照群との間に有意差を認めず、また、血液生化学検査値に対しても問題となる影響は認めなかった。したがって、

SE-86 の食品素材としての安全性は高いものと考えられる。

以上のごとく、セロビオースを主成分とするセロオリゴ糖は、上部消化管での消化吸収を逃れ下部消化管に達する難消化性糖類である。単回投与によって血糖値の上昇ならびにインスリンの追加分泌はほとんどみられず、また、連続投与によって体脂肪率、フルクトサミン、T-cho、TG の低下など耐糖能障害や高脂血症予防の可能性が示唆されたことから、成人病予防を目的とした機能性素材としての利用が可能であろう。

要 約

バイオリクターを用いて、セルロースからセロビオースを主成分とするセロオリゴ糖を生産し、その消化吸収性および生体に及ぼす影響についてラットおよびヒトで検討した。その結果は以下のとおりである。

1) セロオリゴ糖は唾液アミラーゼ、胃液、膵臓アミラーゼによりまったく加水分解されなかった。しかし、ラット小腸粘膜酵素により部分的に加水分解され、グルコースの生成が認められた。

2) ラットではセロオリゴ糖負荷により血糖値の緩徐な上昇がみられたが、ヒトにおいては血糖値の上昇は認められなかった。一方、インスリンの追加分泌はラット、ヒトとも認められなかった。

3) ラットにおいて、セロオリゴ糖を単回投与しても糞便中への排泄は認められなかった。

4) ラットを高シヨ糖食あるいはセロオリゴ糖添加高シヨ糖食で 4 週間飼育したところ、セロオリゴ糖添加高シヨ糖食群では、高シヨ糖食で飼育した対照群に比べ体脂肪率、血清フルクトサミン、総コレステロールおよび中性脂肪濃度が、低値を示した。また、セロオリゴ糖添加高シヨ糖食は血清総タンパク質、アルブミン、ALP、カルシウム濃度に影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、セロビオースを主成分とするセロオリゴ糖は難消化性の糖類であり、糖代謝に影響を及ぼし、糖尿病や肥満予防に役立つ可能性が示唆された。

文 献

- 1) Watanabe, T., Satouchi, M., Tsumiya, T., Nakajima, M., Koshijima, T., Kuwahara, M., Wakabayashi, S. and Ohokuma, K.: Proceedings '94 Cellulose R&D (The Cellulose Society of Japan), 81 (1994), (Tokyo)
- 2) Anderson, D.W., Daabees, T.T., Applebaum, A.E., Filer, L.J., Jr. and Stegink, L.D.: *J. Nutr.*, 113, 1039 (1983)
- 3) 菱本真幸, 松元美幸: 食品工業, 37, 54 (1994)
- 4) 岡田勝秀, 米山 勝, 万代隆彦, 阿賀 創, 堺 修造, 市川富夫: 栄食誌, 43, 23 (1990)
- 5) Ebihara, K., Imamura, Y. and Kiriya, S.: *J.*

- Nutr.*, **109**, 2106 (1979)
- 6) Harper, A.E. : *J. Nutr.*, **68**, 405 (1959)
 - 7) 若林 茂, 里内美津子, 野上義喜, 大隈一裕, 松岡 瑛 :
栄食誌, **44**, 471 (1991)
 - 8) 有塚 勉, 田中勝三郎, 桐山修八 : *栄食誌*, **42**, 295 (1989)
 - 9) 中川靖枝, 辻 啓介, 岩尾裕之, 辻 悦子, 鈴木慎次郎 :
栄養誌, **39**, 115 (1981)
 - 10) Cummings, J.H. : *Gut*, **22**, 763 (1981)
 - 11) Chen, W.L., Anderson, J.W. and Jennings, D. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **175**, 215 (1984)
 - 12) 井上修二, 佐藤 忍 : 大和ヘルス財団研究業績集, **10**, 61 (1986)
 - 13) 中川靖枝, 辻 啓介, 辻 悦子, 鈴木慎次郎 : *栄養誌*, **38**, 197 (1980)
 - 14) 中川靖枝, 辻 啓介, 辻 悦子, 鈴木慎次郎 : *栄養誌*, **39**, 47 (1981)
 - 15) 若林 茂, 植田由香, 松岡 瑛 : *糖尿病*, **35**, 873 (1992)
 - 16) Aro, A., Unsitupa, M., Voutilaine, E., Hersio, K., Korhonen, T. and Siitonen, O. : *Diabetologia*, **21**, 29 (1981)
 - 17) Jenkins, D.J.A., Leeds, A.R., Gassull, M.A., Cochet, B. and Alberti, K.G.M.M. : *Intern. Med.*, **86**, 20 (1977)
 - 18) Gordon, T. : *Cereal Foods World*, **34**, 517 (1989)

(1996年2月5日受理)