

学位論文題名

カルシウム吸収を促進する新規食品素材の開発

学位論文内容の要旨

カルシウムは、1.4~2.2%とミネラルの中で最も生体に多く含まれており、その99%はリン酸カルシウムの形で骨格中に存在し、骨の成熟とともに結晶型のヒドロキシアパタイトとして骨の強度に寄与している。このため、カルシウムが十分に存在することにより骨は硬く、強くなり、体重を支えることが可能となるのである。逆にカルシウムが不足することにより骨密度が低くなり、現在問題となっている骨粗鬆症などの疾病が引き起こされるのである。また残りの1%は細胞内などに存在し、筋肉の収縮と弛緩、血液凝固、神経伝達、生体膜の物質輸送と分泌、細胞内情報伝達など種々の機能発現に関与している。このように生体、生命維持にとってカルシウムは必要不可欠な元素なのである。

しかし現状におけるカルシウムの摂取状況は厚生省の呼びかける所要量に対し、平均充足率で男性で96%、女性で90%でしかない。この様に「飽食」と言われる現代においてもカルシウムの摂取不足は深刻な問題である。

カルシウム不足を補うためには、カルシウムの摂取量を増やすことはもちろんであるが、カルシウムを効率よく摂取する必要がある。当研究室でのこれまでの研究において、食物繊維摂取によるミネラルの利用性に関しては肯定的な結果が多く、特に水溶性食物繊維であるグアガム加水分解物（GGH）について多くの知見が蓄積されている。GGHは主として盲腸発酵の結果、大腸でのカルシウム吸収を亢進すると考えられている。またカルシウム吸収を促進する物質としてはカゼインホスホペプチド（CPP）が知られているが、CPPはその分子中に存在するホスホセリンが3~4分子集まって形作っているリン酸基クラスターが小腸下部でのカルシウムのリン酸塩形成を阻止し、吸収されやすい形に保っていることによりカルシウムの吸収を亢進していると言われている。

以上より、カルシウム吸収を促進する新規食品素材として水溶性食物繊維の基本機能に着目し、この食物繊維にリン酸基を導入してリン酸基クラスターを形成することが出来れば、CPPの様にカルシウムのリン酸塩形成を阻止し、小腸下部での吸収率を高めるとともに、食物繊維が元来持っていた発酵性により大腸での吸収の亢進作用、さらに水溶性食物繊維の持つ整腸作用などの機能性も期待できると考えた。

これらを踏まえ、本研究ではGGHに有機化学的手法によりリン酸基を導入し、*in vitro*でのリン酸カルシウム形成阻害能を調べるとともに、ラットによる*in vivo*でのカルシウム吸収亢進能の有無、さらには骨粗鬆症などのカルシウム不足が起因となる疾病の予防・改善の可能性について研究することを目的とした。

1. 水溶性食物繊維にリン酸基を導入することにより、CPPを上回るカルシウム吸収亢進

作用（カルシウム塩の沈殿形成阻害作用）を持たせることを目的として、GGH にアルカリ条件下でメタリン酸ナトリウムを反応させ、リン酸化 GGH (P-GGH) を得た (1.01 mol - Pi / kg - P-GGH)。In vitro でのリン酸カルシウム沈殿形成阻害能を調べるために、20 mM リン酸緩衝液に得られた P-GGH と、GGH、CPP を溶解して上清中のカルシウム濃度を測定した。その結果、P-GGH は CPP と同程度の沈殿形成阻害能を示した（含有 Pi 量より Pi と Ca のモル比では P-GGH の方が阻害能は上、GGH は阻害作用を示さず）。また電気伝導度、イオン濃度の測定結果より、P-GGH の沈殿形成阻害作用は分子中のリン酸基と複数の Ca^{2+} との間の弱いキレート結合によるものと推測した。

2. 1 において P-GGH が in vitro において CPP 同様の機能性を発現する事を確かめた。しかし in vitro でリン酸カルシウムの沈殿形成阻害作用が認められても in vivo において作用を示さなかったという報告もある。そこで in vivo での効果を検討するため P-GGH と GGH をそれぞれ食餌中に添加して、ラットにおけるカルシウム吸収への影響を調べた。その結果、ラットを用いた試験では出納試験における見かけのカルシウム吸収と大腿骨中のカルシウム量が GGH 食やコントロール食と比較して P-GGH 食で有意に高くなっていた。さらに回腸における可溶性カルシウム量が GGH 食と比べて P-GGH 食で有意に多くなっていた。これらの結果より、P-GGH は小腸下部におけるリン酸カルシウムの形成を阻害し、カルシウムの吸収を促進すると考えた。
3. 2 において P-GGH が in vivo においてもカルシウム吸収を亢進することを示した。そして P-GGH が小腸下部（回腸）においてカルシウムの非不溶化を促進していること、また盲腸においてプロピオン酸、コハク酸を中心に発酵性を持っていることが確かめられた。プロピオン酸は酢酸とともにカルシウム吸収への関与が示唆される短鎖脂肪酸であり、P-GGH によるカルシウム吸収の亢進がリン酸基クラスターによるカルシウムの非不溶化なのか盲腸発酵によるものなのか 2 の結果だけでは検討することは出来ないため、P-GGH のカルシウム吸収亢進機能について、盲腸発酵の関与を調べる目的で盲腸切除ラット (CX) および擬手術ラット (S) を用いて試験した。コントロール食、GGH 食、P-GGH 食それぞれを盲腸切除群と対照群に与えた。その結果、P-GGH 摂取 CX および S ラットおよび GGH 摂取 S ラットにおいてコントロール食摂取ラットおよび GGH 摂取 CX ラットと比較して、見かけのカルシウム吸収が有意に高くなった。また大腿骨中のカルシウム量も同様の結果を示した。また、回腸におけるカルシウムの溶解性は、P-GGH 食群において他の食餌群と比べて有意に高くなっていた。これらの結果より、P-GGH によるカルシウム吸収の亢進には盲腸発酵は関与していないことが明らかになった。
4. 閉経後骨粗鬆症は現代社会において大きな問題となっている。ここでは P-GGH のカルシウム吸収亢進機能がこのような疾病の改善に効果があるかどうかについて、卵巣摘出ラット (OVX) および S を用いて 6 週間試験した。コントロール食、GGH 食、P-GGH 食それぞれを OVX 群と S 群に与えた。その結果、回腸におけるカルシウムの可溶化率は、P-GGH 食群において他の食餌群と比べて有意に高くなっていた。カルシウム吸収率は 6 週間で経時的に低下したが、OVX ラットでは S に比べこの低下は大きかった。P-GGH、GGH 摂取はこれらの低下を大きく改善したが、この改善作用は P-GGH で GGH より有意に高かった。骨 Ca 量、骨強度は Ca 吸収の結果を反映し

ており、P-GGH 摂取は卵巣摘出によるこれらの低下をほぼ完全に防止した。

以上のように、水溶性食物繊維である GGH にリン酸基を導入することにより *in vitro* においてリン酸カルシウム沈殿の形成阻害能を持つ P-GGH を得ることに成功し、さらに P-GGH が *in vivo* においてカルシウム吸収亢進能を持つこと、導入したリン酸基がカルシウムの非不溶化、吸収亢進に重要な役割を持っていることを示した。これにより、食物 (P-GGH) の摂取によって疾病の進行を改善出来ることを示すとともに、他の水溶性食物繊維に対するリン酸基の導入による機能性の付与の可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 西 隆 則
副 査 教 授 青 山 頼 孝
副 査 助 教 授 原 博
副 査 助 教 授 川 端 潤

学位論文題名

カルシウム吸収を促進する新規食品素材の開発

本論文は7章より構成され、図 24、表 33、引用文献 102 を含む総頁数 131 の論文である。他に参考文献 3 編と関連公開特許 1 編が添えられている。

カルシウムはミネラルの中で最も生体に多く含まれており、生体、生命維持にとって必要不可欠な元素である。しかし現状におけるカルシウムの摂取状況は所要量に対し、男性で 96%、女性で 90%でしかなく、カルシウム不足を補うためには、カルシウムの摂取量を増やすとともに効率よく摂取する必要がある。

当研究室でのこれまでの研究において、水溶性食物繊維であるグアガム加水分解物 (GGH) によるミネラルの利用性に関して多くの知見が蓄積され、GGH は主として盲腸発酵によって大腸でのカルシウム吸収を亢進すると考えられている。またカルシウム吸収を促進する物質としてはカゼインホスホペプチド (CPP) が知られているが、CPP はその分子中に存在するホスホセリンがクラスターを形成し、回腸でのカルシウムのリン酸塩形成を阻止して吸収されやすい形に保つことにより亢進していると言われている。

以上より水溶性食物繊維の基本機能に着目し、この食物繊維にリン酸基を導入してリン酸基クラスターを形成することによりカルシウムのリン酸塩形成を阻止し、回腸での吸収率を高めるとともに、食物繊維の発酵性により大腸での吸収の亢進、さらに食物繊維の持つ整腸作用などの機能性も期待できると考えた。

本研究では GGH にリン酸基を導入し、リン酸カルシウム形成阻害能を調べるとともに、ラットによるカルシウム吸収亢進能の有無、さらにはカルシウム不足が起因となる疾病の予防・改善の可能性について研究することを目的とした。

1. 水溶性食物繊維にリン酸基を導入することによりリン酸カルシウム沈殿形成阻害能を持たせることを目的として、GGH にメタリン酸 Na を反応させ、リン酸化 GGH (P-GGH) を得た。リン酸カルシウム沈殿形成阻害能を調べるために、リン酸緩衝液に P-GGH と、GGH、CPP を溶解して上清中のカルシウム濃度を測定した。その結果、P-GGH は CPP と同程度の沈殿形成阻害能を示した (GGH は阻害作用を示さず)。また各種測定結果より、P-GGH の沈殿形成阻害作用は

分子中のリン酸基と複数の Ca^{2+} との間の弱い相互作用によるものと推測した。

2. In vivo での効果を検討するため P-GGH と GGH をそれぞれ食餌中に添加して、ラットにおけるカルシウム吸収への影響を調べた。その結果、ラットを用いた試験では出納試験におけるカルシウム吸収と大腿骨中のカルシウム量が GGH 食やコントロール食と比較して P-GGH 食で有意に高くなっていた。さらに回腸における可溶性カルシウム量が GGH 食と比べて P-GGH 食で有意に多くなっていた。これらの結果より、P-GGH は小腸下部におけるリン酸カルシウムの形成を阻害し、カルシウムの吸収を促進すると考えた。
3. P-GGH のカルシウム吸収亢進機能について、盲腸発酵の関与を調べる目的で盲腸切除ラット (CX) および擬手術ラット (S) を用いて試験した。コントロール食、GGH 食、P-GGH 食それぞれを盲腸切除群と対照群に与えた。その結果、P-GGH 摂取 CX および S ラットおよび GGH 摂取 S ラットにおいてコントロール食摂取ラットおよび GGH 摂取 CX ラットと比較して、見かけのカルシウム吸収が有意に高くなった。また大腿骨中のカルシウム量も同様の結果を示した。また、回腸におけるカルシウムの溶解性は、P-GGH 食群において他の食餌群と比べて有意に高くなっていた。これらの結果より、P-GGH によるカルシウム吸収の亢進には盲腸発酵は関与していないことが明らかになった。
4. P-GGH が閉経後骨粗鬆症の改善に効果があるかどうかについて、卵巣摘出ラット (OVX) および S を用いて試験した。コントロール食、GGH 食、P-GGH 食それぞれを OVX 群と S 群に与えた。その結果、回腸におけるカルシウムの可溶化率は、P-GGH 食群において他の食餌群と比べて有意に高くなっていた。カルシウム吸収率は 6 週間で経時的に低下したが、OVX ラットでは S に比べこの低下は大きかった。P-GGH、GGH 摂取はこれらの低下を大きく改善したが、この改善作用は P-GGH で GGH より有意に高かった。骨 Ca 量、骨強度は Ca 吸収の結果を反映しており、P-GGH 摂取は卵巣摘出によるこれらの低下をほぼ完全に防止した。

以上のように、GGH にリン酸基を導入することにより in vitro においてリン酸カルシウム沈殿の形成阻害能を持つ P-GGH を得ることに成功し、さらに P-GGH が in vivo においてカルシウム吸収亢進能を持つこと、導入したリン酸基がカルシウムの非不溶化、吸収亢進に重要な役割を持っていることを示した。これにより、食物 (P-GGH) の摂取によって疾病の進行を改善出来ることを示すとともに、他の水溶性食物繊維に対するリン酸基の導入による機能性の付与の可能性を示した。

よって審査員一同は、渡邊治が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。