

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 山田 貴子
Name

学位論文題目： 抗肥満作用を有する希少糖含有シロップの有効性と安全性に関する研究
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

1. 序論

近年、先進国だけでなく発展途上国においても、ライフスタイルの変化に伴い肥満の割合が増加している。世界の18歳以上の成人のうち13%が肥満であると言われ、小児にも広がりを見せている。肥満は糖尿病、高血圧症、脂質異常症、動脈硬化など生活習慣病と密接な関係にあり、死亡のリスクに繋がることが指摘されている。特に内臓脂肪型肥満を上流にして、耐糖能異常、高脂血症、高血圧などが一個人に集積するマルチプルリスクファクター症候群はメタボリックシンドロームと呼ばれ、動脈硬化が要因となる心臓病や脳卒中などの死因に結び付く。その問題は年々深刻化しており、対応に追われている国も少なくない。メタボリックシンドロームを予防、特に内臓脂肪を低減する食品開発が進んでおり、それらの食品が特定保健用食品や機能性表示食品として上市されている。一方で食生活において、糖質の過剰摂取が肥満の要因の一つとする報告も多く、特に砂糖や異性化糖を含む食品が疑われていることから、これらを多く含む食品を課税対象とする国もある。また高甘味度甘味料に関しても糖尿病のリスクが増加することが報告され、甘味料と食欲、代謝内分泌の関係がクローズアップされつつあり、より体に良い甘味料の開発が必要とされている。

糖質は、細胞の構成成分や生命活動のエネルギー源など様々な役割を担っており、自然界に広く分布している。D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノースなどが自然界に多量に存在している。一方、これに対して存在量が少ない糖は希少糖と呼ばれ、国際希少糖学会により「自然界に存在量が少ない単糖およびその誘導体」と定義されている。希少糖は、代謝経路に入りにくい、エネルギーになりにくいものが多く、様々な生理機能を有することが明らかになっている。D-フルクトースのC3エピマーであるD-プシコース (D-アルロース) は、食後血糖上昇抑制作用や内臓脂肪低減作用、D-アロースは抗酸化作用、D-ソルボースは α -グルコシダーゼ阻害作用、D-タガトースは血清脂質改善作用を持つことなどが報告されている。これらの希少糖の製造方法は酵素異性化あるいはアルカリ異性化が知られており、高純度の希少糖を得るには酵素を用いた方法が適切であるが、商業化には安全な酵素の低価格化が課題となっている。そこでアルカリ異性化法を用いて異性化糖(ブドウ糖果糖液糖)をアルカリ異性化したところ、メタボリックシンドロームを予防する効果を持つ希少糖 (D-プシコース、D-ソルボース、D-タガトース、D-アロース) を含む甘味料 (希少糖含有シロップ) が製造されることが確認できた。本研究では希少糖含有シロップの抗肥満効果および抗糖尿病効果、さらに安全性について検討を行った。

2. 希少糖含有シロップの抗肥満効果の検討

高果糖コーンシロップ (以下HFCS) や高甘味度甘味料は様々な食品や飲料に使用されている。しかしながら、これらの消費量が増加することにより糖尿病や肥満のリスクが高まることが報告されている。D-プシコースには血糖低下作用や脂質代謝改善作用があることが報告されている。これまでに、報告されているD-プシコースの脂質代謝改善作用を調べた研究では、市販飼料(CE-2、日本クレア(株))にD-プシコースを添加した飼料、または炭水化物源としてスターチを一定量とし、その他の糖質源としてセルロース、D-フルクトース、D-グルコースもしくはD-プシコースを添加した飼料、あるいは食物繊維源としてセルロースを一定量添加し、炭水化物源であるスターチの一部をD-プシコースおよびD-フルクトースで置換えた飼料などを用いており、異性化糖に対するD-プシコースの効果は検討されていない。まず、飼料の糖質源を異性化糖の成分であるD-グルコースとD-フルクトースとし、そこへD-プシコースを添加した際に、抗肥満効果があるか否か検討を行った。D-グルコース37.7%およびD-フルクトース22.1%を含む異性化糖飼料 (以下Control) 、ControlにD-プシコースを1.3、2.6、3.9、5.2%

添加した飼料および市販粉末飼料 (CE-2) の各種飼料をそれぞれ4週齢のWistar系雄性ラットに5週間摂取させた。その結果、体重増加量はControl群に比べてD-ブシコース3.9%および5.2%添加群で有意に低値であり、その効果は用量依存的であった。また、総腹腔内脂肪重量は、Control群に比べてD-ブシコース2.6%以上添加群で小さくなった。これらのことから、D-ブシコースは異性化糖に対して体脂肪蓄積抑制効果を示すことが明らかになった。この結果を受け、体脂肪蓄積を抑制するために有用である約5%のD-ブシコースを含んだシロップの製造方法を確立した。このシロップには、D-ブシコース以外にD-タガトース、D-ソルボース、D-アロースなどの希少糖やD-マンノースが同時に含有しており、希少糖含有シロップ (以下RSS) と呼ぶこととした。RSSの抗肥満効果についてラットを用いて検討した。高Starch食を与えるStarch群、Starchの半量をHFCSあるいはRSSに置換えた食餌を与えるHFCS群およびRSS群の3群に分け、それぞれの飼料を4週齢の雄性Wistarラットに8週間摂取させた。その結果、RSS群の体重はStarch群に比べて摂取2週目で有意に低くなり、摂取3週目でHFCS群に比べて有意に低値となった。内臓脂肪重量はStarch群およびHFCS群に比べてRSS群で有意小さくなった (図1)。

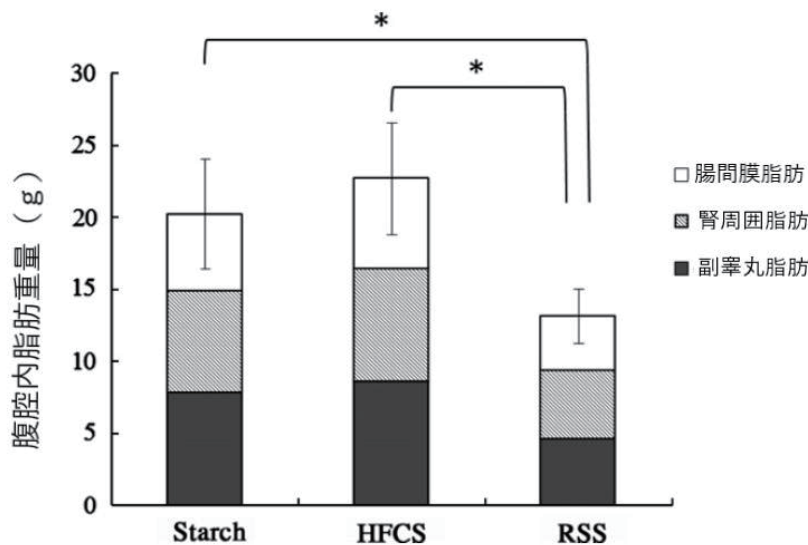


図1 腹腔内脂肪重量

平均値±標準偏差 (mean±SD、n=10)

* Starch群あるいはHFCS群とRSS群の間で5%の危険性で有意差あり

次に、RSSの抗肥満効果がD-ブシコースのみによるものか、それ以外の希少糖も寄与しているのか確認するために、D-ブシコースのみが高含量に含まれたmodified glucose syrup (以下MGS) を製造し、RSSとMGSの抗肥満効果についてラットを用いて比較検討した。4週齢の雄性WistarラットをSucrose群、HFCS群、RSS群、MGS群の4群に分け、それぞれの飼料を8週間摂取させた。その結果、内臓脂肪重量および体脂肪率は、Sucrose群に比べてRSS群で有意に小さくなった。また、体重増加量は、Sucrose群に比べてMGS群で有意に小さくなったが、内臓脂肪重量には有意差を認めなかった。このことから、RSSはMGSに比べて内臓脂肪低減効果が強いことが明らかになった。これらのラットの結果を受けて、ヒトを対象とする試験を行った。軽度の肥満 (BMI (kg/m²) 25 以上 30 未満) を含む健康成人男女 34 名 (平均年齢 42.0 歳、平均体脂肪率 28.2%) を対象にプラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を実施した。試験食としてRSS 30 g (糖質固形分) を含むゼリー飲料 200 g、対照食として同カロリーとなるように調製したHFCS 28 g (糖質固形分) を含むゼリー飲料 200 g を、それぞれ1日1回、朝食前に12週間継続して摂取させた。その結果、体重、体脂肪率、ウエスト周囲径は、いずれも異性化糖摂取群に比べて、RSS群で有意に低値であった。このことから、RSSのヒトにおける体脂肪低減効果が明らかになった (図2)。次に、RSSの1日摂取量を20 gにしたヒト試験を行った。軽度の肥満 (BMI 25 以上 30 未満) が見られる健康成人男女 96 名を対象にプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間試験を実施した。試験食としてRSS 20 gに酸味料、香料を添加した飲料 (350 mL) を被験食品とし、RSSの代わりに同カロリーのHFCS 19 gを配合した飲料 (同容量) をプラセボ食品とし、それぞれ1日1本、朝食前に12週間継続して摂取させた。その結果、体脂肪量および体脂肪率の変化量は、プラセボ食品群に比べて被験食品群で有意に低値であった。このことから、RSSは体脂肪量および体脂肪率を低減させることが明らかになった。

(様式5) (Style5)

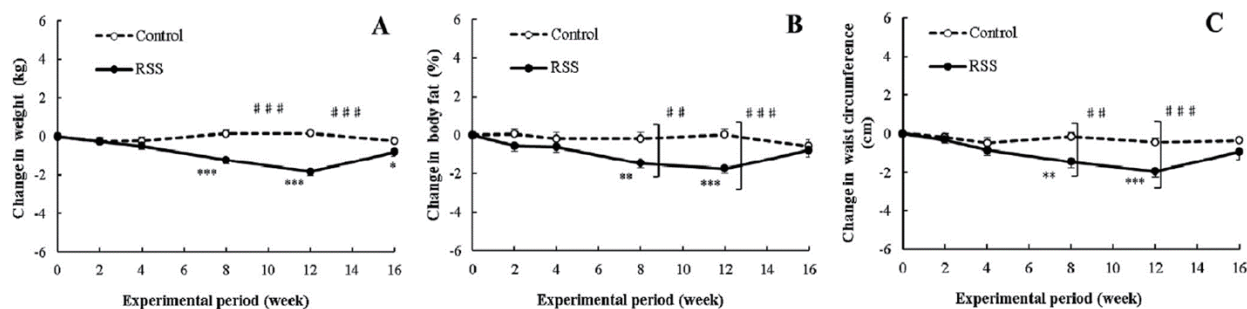


図2 体重の変化量 (A)、体脂肪率の変化量 (B)、ウエスト周囲長の変化量 (C)
 平均値±標準誤差 (mean±SEM)

###,#### 2群間の比較で1%、0.1%の危険性で有意差あり

*,**,*** 0週と比べて5%、1%、0.1%の危険性で有意差あり

3. 希少糖含有シロップの血糖応答の検討

HFCSはショ糖に似た甘味であり、コーンスターチから安価に大量生産できることから食品や飲料に広く使用されているが、HFCSの消費量増加が糖尿病や肥満を発症するリスクファクターの一つであると言われている。D-プシコースには食後血糖上昇を緩やかにする機能があること、その作用機序は α -グルコシダーゼ阻害作用および肝臓におけるグルコキナーゼ (以下GK) 核外移行促進作用であることが報告されている。D-プシコースが含まれているRSSの抗肥満効果を動物実験およびヒト試験において明らかにした。肥満は糖尿病発症リスクの一つであるが、RSSが直接、抗糖尿病効果を発揮するか否かについては検討されていない。そこで、ラットの飲水にRSSを添加し、長期摂取させた際の耐糖能およびインスリン感受性に対する効果について検討した。また、その効果がGK核外移行促進作用によるか否か検討した。6週齢の雄性WistarラットをWater群、HFCS群、RSS群の3群に分け、水あるいは試験糖添加水を10週間摂取させた。飼料についてはAIN-93G処方の基準食を用いた。その結果、体重増加量および内臓脂肪重量は他の2群に比べてRSS群で有意に小さくなった。飼育8週時に実施した糖負荷試験の結果、負荷後の血糖およびインスリン値は他の2群に比べてRSS群で有意に低値であった。また、RSS群の肝グリコーゲン量は他の2群に比べて有意に高値を示し、糖負荷後のGK核外移行はRSS群で有意に増加していた。このことから、RSSは肝臓のGK核外移行を介して耐糖能およびインスリン感受性を改善することが明らかになった。さらに、RSS摂取時の血糖応答について摂取量や食品形態を変えてヒトでの検討を行った。最初に、RSSのグリセミック指数 (GI) 値およびRSSを低用量摂取した際の健常成人の血糖応答について検討した。GI値測定試験については、健常成人10名 (空腹時血糖値 96.6 ± 2.5 mg/dL) を対象とし、一重盲検クロスオーバー試験を実施した。RSS 50 g (糖質固形分) およびショ糖 (同量)、基準食としてD-グルコース (同量) を200 mLの水に溶解し摂取させ、摂取120分までの血糖値を測定した。D-グルコース摂取時の血糖値上昇曲線下面積を基準 (GI=100) とし、RSSのGI値を算出したところ49、ショ糖のGI値は64であった。低用量摂取試験については、健常成人50名 (空腹時血糖値 85.8 ± 1.6 mg/dL) を対象とし、二重盲検ランダム化プラセボ対照クロスオーバー試験を実施した。ショ糖6gまたはRSS 8.8 g (同量の糖固形分量) をコーヒーに溶解した飲料を被検者に摂取させ、120分までの血糖値およびインスリン値を測定した。その結果、血糖曲線下面積およびインスリン曲線下面積は、ショ糖に比べてRSSで有意に低値であった (表1)。このことから、RSSはショ糖に比べて摂取後の血糖応答およびインスリン分泌が低い甘味料であることが明らかになった。

表1 低用量単回試験における血糖値AUCおよびインスリンAUC

	血糖値 AUC (mg · h/dL)	インスリン AUC (μ U · h/mL)
ショ糖	180.9 ± 3.0	9.9 ± 0.7
RSS	177.7 ± 2.8**	9.3 ± 0.6*

平均値±標準誤差 (mean±SEM, n=45)

*, ** ショ糖に比べて5%、1%の危険率で有意差あり

次いで、RSS中に含まれる希少糖（D-ブシコース、D-ソルボース、D-タガトース、D-アロース）の混合物のスクラーゼおよびマルターゼ阻害作用（*in vitro*）について検討した。また、RSSとショ糖を併用して健常成人に単回摂取させた際の血糖応答について検討した。RSS中に含まれるD-ブシコース、D-ソルボース、D-タガトースおよびD-アロースと同じ組成に調製した溶液を用い、 α -グルコシダーゼ活性阻害試験を行った。その結果、スクラーゼ活性に対する阻害作用が強いことが確認された。次に、RSSとショ糖を併用した際の血糖応答試験（糖質 50 g摂取および糖質 10g摂取）を行った。50 g試験については、健常成人10名（空腹時血糖値 96.6 ± 2.5 mg/dL）を対象として、ショ糖50 gおよびショ糖の3割、5割、7割をRSSに置換えたものを被験食品とした。10g試験については、健常成人12名（空腹時血糖値 96.9 ± 1.7 mg/dL）を対象として、ショ糖およびショ糖の5割をRSSに置換えたもの被験食品とした。いずれも200 mLの水に溶解し摂取させ、摂取後120分までの血糖値およびインスリン値を測定した。その結果、50 g試験および10 g試験において、血糖値およびインスリン値はショ糖群に比べてRSS置換え群で有意に低値を示した（図3：10 g試験）。このことから、RSSは α -グルコシダーゼ阻害作用を有し、スクラーゼに対してより強い阻害作用を示すこと、またRSSとショ糖を併用して摂取した場合、スクラーゼ阻害によってショ糖の消化吸収が抑制され、血糖応答を低減させることが明らかになった。

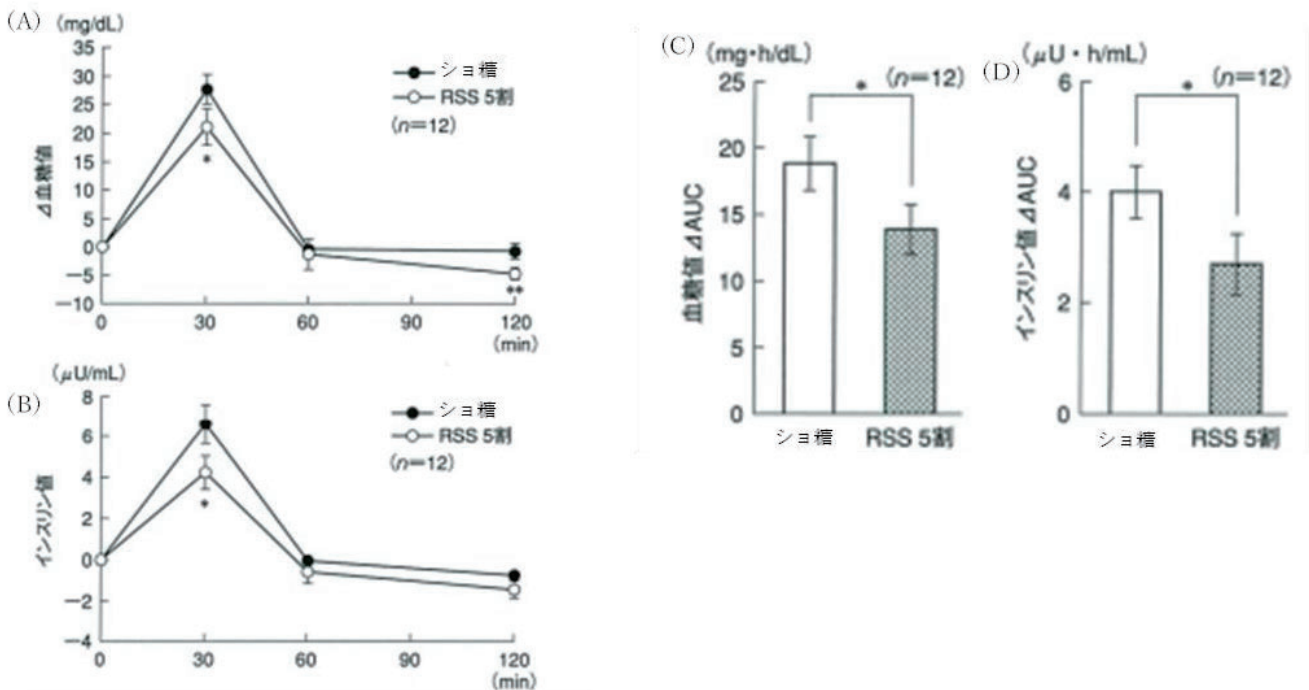


図3 10 g試験における血糖値 (A) インスリン値 (B) の経時変化および血糖値 Δ AUC (C) インスリン値 Δ AUC (D)

平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM, n=12)

*, ** ショ糖に比べて5%、1%の危険率で有意差あり

最後に、炭酸飲料、プリン、わらびもちに含まれるショ糖の一部をRSSに置換えた各食品を摂取した際の血糖応答について検討した。炭酸飲料、プリンおよびわらびもち摂取については、それぞれ健常成人6名（空腹時血糖値 93.0 ± 8.4 mg/dL）、健常成人10名（空腹時血糖値 98.3 ± 8.8 mg/dL）、健常成人14名（空腹時血糖値 95.7 ± 5.4 mg/dL）を対象として、ランダム化一重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験を実施した。炭酸飲料およびわらびもちに含まれるショ糖の5割をRSSに置換えた食品を試験食品とした。また、プリンについては含有するショ糖の3割および5割をRSSに置換えた食品を試験食品とした。いずれもショ糖無置換食品をプラセボとして、各食品摂取前後、計5回採血し、血糖値およびインスリン値を測定した。その結果、試験食品摂取後の血糖曲線下面積は、炭酸飲料、プリン、わらびもちのいずれも、対照食品に比べてRSS置換食品で有意な低値を示したが、インスリン曲線下面積には各食品間に差を認めなかった。このことから、ショ糖の一部をRSSに置換えた食品の食後血糖上昇は、ショ糖のみを配合した食品を摂取した時と比べて緩やかであることが明らかになった。

4. 希少糖含有シロップの安全性の検討

RSSはHFCSをアルカリ異性化することにより製造することができる甘味料である。RSSにはD-ブシコース以外にD-ソルボース、D-タガトース、D-アロース、D-マンノースなど様々な単糖が含まれている。RSSを機能性甘味料として利用するためには、十分な安全性を確認する必要がある。そこで、RSSの安全性について動物試験、in vitro試験、ヒト試験により検討した。最初にラットを用いてRSS長期摂取時の安全性を確認するための検討を行った。4週齢の雄性WistarラットをHFCS群、RSS群の2群に分け、それぞれ40%含む飼料を90日間摂取させた。その結果、RSS群は1日あたり1.31g/kgのD-ブシコースを摂取し、体重増加量および内臓脂肪重量はHFCS群に比べてRSS群で有意に小さかった。一方、肝臓および腎臓重量はHFCS群に比べてRSS群で有意に大きかったが、肉眼的病理所見はなく、RSSとの因果関係は不明であり、病理組織検査でも異常は認められなかった。また、血液学的検査および血液生化学検査においてもRSSの毒性は認められなかった。このことから、ラットにおいて40% RSSを90日間摂取した場合でも安全であることが確認できた。さらに、RSSの安全性評価の一環として、ラットを用いた単回投与毒性試験、細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類動物を用いた染色体異常試験およびヒトにおける緩下作用あるいは胃腸症状の発現を見ない単回摂取時の最大無作用量を推定するための検討を行った。単回経口投与毒性試験については、6週齢の雌雄Crl:CD系ラットを対照群およびRSS群に分けた。対照群には日本薬局方注射用水を、RSS群にはRSS (15,000 mg/kg体重)を20 mL/kg体重の液量で強制経口投与した。投与14日目まで観察後、剖検した。その結果、観察期間を通じて、雌雄全群に死亡例は認められなかった。RSS群で投与後1日目まで雌雄数例軟便等が認められたが、その後回復した。RSSの変異原性については、ネズミチフス菌および大腸菌を用いて復帰突然変異試験により評価した。その結果、RSSの変異原性は陰性と判定された。チャイニーズハムスター肺由来 (CHL/IU) 細胞を用いてin vitroで染色体異常試験を行った。その結果、RSSはCHL/IU細胞に対して染色体異常を誘発しないと判断した。健常成人男女9名を被験者とし、一過性下痢に対するRSS単回摂取時における最大無作用量試験を実施した。被験者に体重 (kg) 当たり0.9、1.0、1.1、1.2、および1.3 g (固形分換算) のRSSを100 mLの水溶液に溶解し、低用量から順に1週間以上の間隔を空け一回摂取させた。摂取前、摂取時および摂取後の腹部症状および便の性状についてアンケートを実施した。その結果、RSSは0.9 g/kg体重程度が緩下作用に対する最大無作用量であった (表2)。緩下作用を発現した時の腹部症状は一過性の症状であった。このことから、RSSは急性毒性、変異原性、染色体異常を有しないことが判明し、健常成人男女における最大無作用量は0.9 g/kgであることが明らかになった。

表2 RSS摂取後の緩下作用発生状況

No.	Sex	Rare sugar syrup intake (g/kg body weight)				
		0.9	1.0	1.1	1.2	1.3
1	M	×	●	—	—	—
2	F	×	●	—	—	—
3	F	×	×	×	●	—
4	M	×	×	×	●	—
5	M	×	×	×	●	—
6	M	×	×	×	×	×
7	M	×	×	×	×	×
8	F	×	×	×	×	×
9	F	×	×	×	×	×

●：下痢、×：下痢なし、—：摂取なし

最後にRSSをヒトが長期摂取した際の安全性についてRSSの摂取量を変えて (1日当たりRSS摂取量20 gおよび30 g) 検討を行った。軽度の肥満 (BMI (kg/m²) 25 以上 30 未満) を含む健常成人男女 3 4 名を対象にプラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を実施した。試験食としてRSS 30 g (糖質固形

(様式5) (Style5)

分) を含むゼリー飲料 200 g、対照食として同カロリーとなるように調整したHFCS 28 g (糖質固形分) を含むゼリー飲料 200 g を、それぞれ1日1回、朝食前に12 週間継続して摂取させた。摂取前、摂取 2、4、8、12週後および後観察期間 (摂取終了4週後) に採血、尿検査および医師の問診を行った。その結果、血液検査ではいくつかの項目で変動があったものの、腎機能や肝機能に関する項目では異常は認められなかった。また、尿検査の結果も異常は認められなかった。このことから、RSSは長期摂取しても安全な甘味料であることが明らかになった。さらに、軽度の肥満 (BMI (kg/m²) 25 以上 30 未満) が見られる健常成人男女 96 名を対象にプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間試験を実施した。試験食としてRSS 20 gに酸味料、香料を添加した飲料 (350mL) を被験食品とし、RSSの代わりに同カロリーのHFCS 19 gを配合した飲料 (同容量) をプラセボ食品とし、それぞれ1日1本、朝食前に12 週間継続して摂取させた。摂取開始時、摂取4、8、12週目に診察、生理学的検査、血液検査、尿検査を実施した。血液検査項目及び尿検査は基準値内の変動であったことから臨床問題なく、生理学的検査項目についても差を認めなかった。有害事象についても一過性のものであり、RSSとの因果関係は「なし」または「おそらくなし」と判断された。このことから、RSSを20 g配合した食品を摂取することは安全性に問題ないことが明らかになった。

5. 結論

本研究成果によって、希少糖含有シロップは抗肥満効果および抗糖尿病効果を有する安全な食品であることが明らかになった。これらの結果は、希少糖含有シロップを機能性甘味料として利用するにあたって、極めて意義のある内容であると考えられる。

(注) 要約の分量は、学位論文の分量の約10分の1として下さい。図表や写真を含めても構いません。

(Note) The Summary should be about 10% of the entire dissertation and may include illustrations