

農畜産物由来成分の消化管への機能性に関する研究

2014

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(帯広畜産大学)
荒井 克仁

目次

I. 緒言	1
II. ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質画分の大腸腺腫発症抑制効果	7
実験方法	9
(1) ナガイモ凍結乾燥物の作成	9
(2) 実験動物	9
(3) ナガイモタンパク質画分の調製	9
(4) ナガイモタンパク質画分の酵素的分解	10
(5) ナガイモタンパク質の同定・確認	10
(6) ヒトがん細胞の増殖に与える影	12
(7) 動物実験	13
(8) 大腸腺腫数測定	13
(9) アポトーシス誘導評価	13
(10) 統計処理	16
実験結果	16
1. ナガイモタンパク質の抽出と酵素的分解	16
2. 細胞増殖への影響	19
3. 大腸腺腫数の測定	19
4. アポトーシス誘導評価	25
考察	25
要約	31

III. デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎モデルマウスにおける	
食事性スフィンゴ脂質の効果	33
実験方法	39
(1) コーン由来 GlcCer ならびに鶏皮由来 SM の調製	39
(2) 実験動物	40
(3) 動物実験	40
(4) 大腸粘膜組織の観察	43
(5) 大腸ミエロペルオキシダーゼのウエスタンブロット解析	43
(6) 大腸粘膜組織におけるサイトカイン発現のアレイ解析	43
(7) 統計解析	44
実験結果	44
1. マウス大腸炎炎症症状に与える影響	44
2. 解剖時組織所見	44
3. 大腸 MPO のウエスタンブロット解析	46
4. 大腸粘膜組織における各種炎症性サイトカイン 発現の解析	46
考察	52
要約	59
IV. 総合考察	61
V. 参考文献	68

I. 緒言

本研究では第一のテーマとして未利用農畜産物の有効利用を取り上げた。農畜産物が市場に供給されるに当たり、生産物の形状や重量等の規格が定められ、生産者はその規格を満たした物のみを市場に提供する。しかしながら製品を生産するに当たり、一定の割合で、その規格に収まらない規格外品や、生産の過程において何らかの障害によりに傷や形態不良といった不良品が生じる。また、農作物では天候により生産過多となった場合、市場での価格維持のため、収穫せずに農地において直接廃棄する場合もある。さらに市場に流通したのも全てが消費されるわけではなく、売れ残りや加工残渣として廃棄されるものも多く、これらの一部は、加工用として利用され加工品や家畜飼料として利用されるが、多くは未利用物として廃棄処分となる場合も多い[1]。しかしながら、これらの未利用物は、成分的には市場に流通する農畜産物と同等であり、その中には数多の有用成分を含む物も数多く存在する。これらの有用成分の新たな機能性を評価することにより、農畜産物に付加価値が上昇し、未利用物の利用増加につながり、資源の有効利用や機能性素材の安価な供給源の創造、新たな産業の育成、生産者の利益の上昇といった有用な面が多く期待できる。

本論文では未利用物由来の有用成分のモデルとして、北海道十勝圏での主要な農産物であるナガイモの塊茎貯蔵タンパク質および、真菌から哺乳動物に至るまで普遍的に存在する機能性脂質であるスフィンゴ脂質を試料とした。

第2のテーマとして下部消化器官疾患を取りあげた。下部消化管は小腸、大腸、ならびに肛門からなる消化管であり第一の役割として食物の消化ならびに栄養素の吸収が挙げられる。小腸の役割は主に消化および栄養素吸収である。

胃にて消化された食物は小腸に送られ、タンパク質分解酵素のトリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ、脂質分解酵素の膵リパーゼ、糖質分解酵素のアミロプシン（膵アミラーゼ）、マルターゼ、ラクターゼを含む膵液ならびに小腸上皮細胞由来の酵素により酵素的分解を受けペプチドや脂肪酸といった低分子成分になり小腸上皮細胞を經由して血管、リンパ管に吸収される。また脂質の乳化を促進し吸収効率を上昇する胆汁も小腸にて排出再吸収される [2; 3]。一方大腸の主な役割の一つが、水分の吸収と食物繊維などの難消化性成分の分解、カリウム、ナトリウム塩といった塩分の吸収である。小腸にて消化吸収を受けた消化物残渣には多量の水分ならびに小腸では消化されない難消化性成分、未吸収成分が含まれる。大腸には消化酵素は存在しない、そのため分解には大腸菌を始めとした他種多様な腸内細菌の働きによる発酵が重要となる。発酵作用により難消化性成分は分解され吸収可能な電解質まで分解される。この過程において副産物として生成された短鎖脂肪酸が大腸の主要なエネルギー源ともなる。また腸内細菌の活動により生成されるビタミンが存在することも知られている [2; 3; 4]。

第二の役割として腸管免疫が挙げられる。消化管はその両端である口腔と肛門が外界に接しているため、体の内部にありながらも外と接している部位である。また食品や飲料、病原体などの所謂、異物と接する機会も非常に多い。これらの異物から身を守るために発達した仕組みが腸管免疫系である。腸管免疫系を構成しているのは、パイエル板、小腸上皮細胞とそこに存在する腸管固有リンパ球、粘膜固有層とそこに存在する粘膜固有リンパ球である。パイエル板は腸管固有のリンパ小節の集合体であり、腸管内腔側から細菌などの抗原を取り込み、基底膜側で接触している T 細胞や B 細胞、マクロファージに提示し、パイエル板内の免疫細胞群に抗原情報を伝達する役割を持つ M 細胞と接してい

る。受け取った抗原情報はパイエル板にて情報が処理され、異物に対する免疫応答や免疫寛容が誘導されていると考えられている。また上皮細胞間に存在する腸管固有リンパ球や粘膜固有層リンパ球といった、最前線に常駐する免疫細胞系の存在により、侵入した異物に対する即時の応答が可能となされている。

また、消化管の粘膜は環境と接しており病原性微生物の最大の侵入経路となるため、独自のバリア系が構築されている。たとえば、小腸の陰窩底部の幹細胞領域には、幹細胞を護衛するかのようにパネート細胞が存在する。パネート細胞は Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) や NOD 受容体 (NOD : nucleotide-binding and oligomerization domain) を介して微生物を認識し、ディフェンシンなどさまざまな抗菌ペプチドを産生して、病原微生物の侵入を防ぐと同時に常在する細菌の構成にも影響をあたえている。また、腸管の上皮には杯細胞が存在し、杯細胞からはたえず粘液が産生されている。大腸ではこの杯細胞のはたらきにより非常に厚い粘液層が形成される。細菌は粘液層の外層までは入り込むことができるが、上皮細胞の直上の粘液層の内層はムチンドウしが密に結合しているため入り込めず、それにより細菌が直接に上皮に触れることをさまたげ侵入を阻んでいる [2; 3; 5; 6]。

さらに腸内細菌も消化管免疫系に深い影響をあたえている。たとえば、無菌マウスではパイエル板、孤立リンパ小節、腸間膜リンパ節が非常に小さく、脾臓の B 細胞領域および T 細胞領域の形成が不十分である。さらに、全身において CD4 陽性 T 細胞に対する応答が Th2 細胞に対する応答にかたよっており、血中の免疫グロブリン E の濃度も SPF 環境において飼育したマウスと比べ有意に高く、すなわち、アレルギーを起こしやすい状態になっていることが示されている。また、無菌マウスの消化管の上皮は外的なストレスに対し脆弱であり、デキストラン硫酸ナトリウムによる腸炎の誘導に対し感受性が高いことも知ら

れている[7]. 本研究では, これらのように, 免疫の中心となっている下部消化器官の疾患として, 免疫応答に深くかかわる大腸ガンならびに炎症性腸疾患に着目した.

国内の各種ガンの罹患者は現在, 1950年代と比較し急激に増加している. この中で大腸ガンは日本における各種ガン罹患者数で肺がんに次ぎ第2位となっており, 死亡率も女性では現在各種ガン中1位, 男性でも2020年には1位になることが予測されている[8]. 一方で, 炎症性腸疾患は, 主に大腸のみに炎症を生じる潰瘍性大腸炎と口腔から大腸に至る消化管全部位に炎症を生じるクローン病の疾患からなる. さらに潰瘍性大腸炎は大腸ガンリスクの増大を引き起こすことも知られている. この疾患は現在までに原因, 完治療法ともに不明であり, 日本においては特定難病に指定されている. 日本における炎症性腸疾患の罹患者数は現在11万人程度(潰瘍性大腸炎約10万人, クローン病約1万人)であるが, 1950年代以降の増加率が大きき疾患であり将来的には100万人を超えることが予測されている. これらの疾患は下部消化器官を代表する疾患であり, 双方の疾患とも大きな原因の一つに, 動物性タンパク質や脂質摂取量の増加, 野菜類摂取の減少といった, いわゆる「食の欧米化」が深くかかわっているとされている[9; 10]. そのため食品機能性素材を利用して, 予防または症状緩和の観点から数多くの報告がなされている.

II章では北海道十勝圏の主要作物の一つであるナガイモの塊茎貯蔵タンパク質の大腸ガン発症抑制効果を検討した. ナガイモを含むヤマノイモ類[11]は日本において古来より滋養強壯の効果があるとして食されている. また中国においては漢方薬「山薬」として利用されており, 止瀉の効能を有するとされている. このように古来よりいわゆる機能性食品として利用されてきた食品であるが, 近年では機能性の詳細な研究がなされており, 様々な効果が報告されてい

る [12; 13; 14].

著者の所属する研究室においてもナガイモの機能性として大腸腺腫抑制効果を報告している [15; 16]. この報告の中では他種比較を行っており, ナガイモが最も大腸腺腫発症抑制効果が強いことが示されている. ナガイモの特徴として塊茎の粘りが挙げられるが, その粘りの主要成分の一つに貯蔵タンパク質がある. ナガイモの貯蔵タンパク質は特徴的であり, 約 80% が dioscorin という糖タンパク質で占められている [17; 18; 19; 20; 21]. dioscorin は機能性をもつタンパク質でありトリプシン阻害活性やアンギオテンシン変換酵素阻害活性, 免疫賦活作用などが報告されている. これらの機能性を有することから, ナガイモの大腸腺腫抑制効果の活性本体の一つとして貯蔵タンパク質が考えられる. また経口で摂取したタンパク質は体内の消化酵素の影響により容易に分解されることが推測されるので, 分解物の効果も同時に検討した.

Ⅲ章ではスフィンゴ脂質を試料として炎症性大腸炎に対する効果を検討した. スフィンゴ脂質は真核生物に普遍的に存在する膜構成脂質であり, その構造はスフィンゴイド塩基と脂肪酸からなるセラミド骨格を基本とし, 糖またはリン酸コリンの極性基を有する [22]. 動物および植物では主要なスフィンゴ脂質が異なり動物ではスフィンゴミエリン (SM) が, 植物ではグルコシルセラミド (GlcCer) が主なスフィンゴ脂質である [23]. これらのスフィンゴ脂質では様々機能が報告されており, 現在では主に GlcCer が化粧品や食品素材として利用されているスフィンゴ脂質は炎症に対する効果や, 大腸ガン抑制効果を持つことから [24; 25], 炎症性腸疾患の予防, 症状緩和にも効果があることが推測され, 実際に SM に関しては炎症性腸疾患モデルに対する効果が検討されている. しかしながらこれらの報告では大腸炎症の改善, 悪化の双方の結果が示されており議論が分かれている [26; 27]. 本章では, SM および GlcCer 双方を試料と

し，一般的な炎症性腸疾患モデルとして広く使用される，デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎モデルマウス系を用いてその効果の検証と作用機序の解析を行った．

II. ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質画分の大腸腺腫発症抑制効果

ヤマイモ種 (*Dioscorea* spp.) は食用植物としてアジア, アフリカ, 中南米およびオセアニア諸国において年間 5000 万トン生産されている. 日本においては中国南東部原産のナガイモ (*Dioscorea opposita* Thumb) が主要な種類であり, 他に自生種のジネンジョ (*Dioscorea japonica* Thumb) なども見られる [11]. ナガイモは主に中国, 台湾および日本で栽培され, 生食や漢方薬あるいは食品の添加材として使用されている. 日本では特に青森県と北海道で多く生産されており, 生産量は年間 11 万トン (2011 年) に達する [28]. 北海道では十勝地方が主要な産地であり, 川西産ナガイモはブランド商品として国内だけでなく, 台湾をはじめとした海外市場においても高い評価を得ている.

ヤマイモ種は世界各地で古来より, 滋養強壮や整腸作用の効果を有することが伝承されており, 近年では民族薬理学的観点からも注目され, 食品機能性に関して種々の研究がなされ, 腸管蠕動運動活性化 [13] や, 糖代謝改善作用 [29], 抗酸化作用 [12] などについて報告されている. また, 塊茎には主要な水溶性貯蔵タンパク質である dioscorin が存在する [17; 18; 20]. このタンパクはヤマイモ種に特有のタンパク質であり, 免疫賦活活性 [30; 31; 32], アンジオテンシン変換酵素阻害活性 [33], 抗酸化活性 [34] などの機能性を有することが明らかとなっている.

近年わが国において, 大腸ガンの罹患者数が増加しており, 1980 年代と比較し増加しており現在では男女ともに 2 番目に多い罹患者数を示す [8]. この原因として, 動物性油脂類摂取の増加や野菜摂取量の減少といった, いわゆる食の欧米化や生活習慣の変化が主に考えられている. また, 大腸がんの予防に関し

では、がんの前段階にあたる大腸腺腫（Aberrant crypt foci: 以下 ACF）の発症予防が大腸がん予防に深く関わると考えられている [35]。このため予防的な観点からの食材ならびに食品の開発・研究が行われている [36; 37; 38; 39]。

このような背景より所属研究室においても、食事性因子による大腸ガンの初期段階における予防という観点から、腸管への機能性が伝承されているナガイモを用いて、ACF を人為的に発症させたモデルマウスにおいて評価を行い、ナガイモの経口投与が ACF の発症を抑制することを報告した [16]。また同様の実験系において他のイモ類との比較において、ナガイモ塊茎がもっとも強い抑制効果を有することが明らかとした [15]。

本研究ではナガイモの ACF 発症抑制効果の活性本体の探索と作用機序の解明を目的とし、ナガイモタンパク画分およびその酵素分解物について、ACF 発症抑制効果の検証を行うとともに、その機構について考察した。

実験方法

(1) ナガイモ凍結乾燥物の作成

北海道帯広市川西農協より購入したナガイモ(平成20年北海道産)を用いた。以下にその加工方法を記す。

ナガイモ(100 kg)を洗浄した後に表皮を剥離し、スライス、凍結乾燥、および粉碎処理を行って、ナガイモ凍結乾燥物(以下、ナガイモFD)を作製した。

(2) 実験動物

実験動物はBalb/cマウス(4週齢 オス)を(株)日本クレアより購入し、プラスチックゲージにて1ゲージ5匹、室温22℃、湿度50%、12時間明暗周期(明期:午前8時~午後8時)の条件で飼育した。飼育中は飼料、飲水ともに自由摂取とした。

本実験は帯広畜産大学動物実験委員会の認証を受け、帯広畜産大学動物実験等に関する規程を遵守した上で行った。

(3) ナガイモタンパク質画分の調製

ナガイモ凍結乾燥粉末(以下、ナガイモFD)は北海道立十勝圏食品加工技術センターから提供されたものを使用した。100gのナガイモFDを5Lの水に溶解し、4℃条件下で一晩の攪拌を行い、タンパク質画分を抽出した後、遠心分離(8000G, 4℃ 40分)により抽出残渣を取り除いた。得られた上清に対して50~100%の硫酸アンモニウムを段階的に加え4℃で一晩の静置によりタンパク画分を沈殿させた、沈殿物を遠心分離(8000G 4℃ 40分)により回収

し、脱塩のためセルロース膜にて透析をかけ、得られた膜内容物を凍結乾燥しナガイモタンパク質画分を得た(Fig. 1). なお、ナガイモタンパク質画分は実験使用前に殺菌のため 65℃の条件で 30 分加熱処理をして実験に使用した.

(4) ナガイモタンパク質画分の酵素的分解

ナガイモタンパク質画分の分解には市販のプロテアーゼを用い、4%タンパク質画分水溶液に終濃度 0.24%でプロテアーゼ A , AmanoG (天野エンザイム) を添加し、ウォーターバスにて 37℃条件下で 6 時間振盪し分解した[40]. 分解処理後、酵素失活のために、90℃で 10 分間の加熱処理を行った. これを凍結乾燥して、ナガイモタンパク質分解物を得た.

(5) ナガイモタンパク質の同定・確認

(2) 並びに (3) で得られた、ナガイモタンパク質、並びにその分解物の一部は蒸留水に溶解したのち、タンパク質濃度を Lowry 変法を用いて測定し、分子量並びにタンパク質のおおよそのパターンを確認するために Laemmli 法 [41]のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供した. 詳細は以下のとおりである.

使用泳動ゲル : e-パジェル E-12.5(ATTO), ゲル濃度 12.5%

泳動バッファー : トリスグリシンバッファ(25 mM トリス, 192 mM グリシン, 0.1% SDS, pH8.4),

泳動電圧 : 20mA 定電流

サンプル量 : サンプル 5 μ g/ml (タンパク質量として)

分子量マーカー : AE-1430 EzApply(ATTO)

A



B



Fig. 1 Fractionation of storage proteins from Chinese yam
A: freeze-dried sample of Chinese yam. B: A freeze-dried sample of storage protein from Chinese yam.

(6) ヒトガン細胞 の増殖に与える影響

ヒトガン細胞系としてヒト結腸がん由来細胞種 Caco-2 を使用した。培地は DMEM (10%牛胎児血清, 2 μ M L-グルタミン, 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン, 1 mM 炭酸水素ナトリウム) を用いて, Caco-2 を 24 穴細胞平底プレートに播種し, 37°C, 5%CO₂ 濃度, 湿潤条件で培養した。2 回継代後にサブコンフルエントまで培養し, 終濃度 100 μ g/ml のナガイモタンパク質分解物または 12 μ g/ml のプロテアーゼ A を加えた DMEM(0.1% BSA, 2 μ M L-グルタミン, 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン, 1 mM 炭酸水素ナトリウム) に置換し, 24 時間または 48 時間同様の条件で培養した。培地置換直前 (0 時間) および 24, 48 時間での細胞数を血球計算板にて計測し細胞増殖率を算出した。細胞増殖率は各培地での (24 または 48 時間の細胞数/0 時間の細胞数) で示した。また, 上記と同一条件化で, 細胞の形態の変化を調べる目的で, Caco-2 細胞を Lab-Tec Chamber スライドを用いて培養し, 既報[42]に則り, 形態特に, 核の形態に関して観察した。さらに TUNEL 染色によりアポトーシス陽性細胞の検出を行った。染色は TACS 2 TdT-Fluorescein Kit (Invitrogen) を用いた。具体的にはリン酸緩衝生理的食塩水 (以下 PBS と省略) で 2 回洗浄した後, プロテアーゼで処理し, 次いで蒸留水で洗浄してから 1×TdT labeling Buffer で洗浄し, 37°C 湿潤の条件で Labeling Reaction Mix と反応させた。反応後 1×Stop buffer で洗浄し暗条件, 室温下で Strep-Fluorescein と反応させた。これを PBS で洗浄後, 4'6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)による対比染色を行った。アポトーシス細胞は, DAPI および TUNEL 染色の双方が陽性の核のみアポトーシス陽性と判定した。

(7) 動物実験

マウス購入後 1 週間、市販飼料 CE-2（日本クレア）で飼育した後、マウスを無作為に 10 匹ずつ 6 群に振り分け、試験食として AIN-93G 食の組成を基本 [35; 43] とした、コントロール食、0.5 または 1% ナガイモタンパク画分含有食、0.5% ナガイモタンパク分解物含有食のいずれかを与えた。またポジティブコントロールとして木下らの報告 [15; 16] で効果が認められた組成を参照したナガイモ FD 含有食を供与する群を設けた (Table 1)。試験食供与 1 週間後から 15mg/kg の 1,2-Dimethyl hydrazine（以下 DMH と省略）をマウス腹腔に週 1 回の頻度で投与し、8 週の飼育により大腸 ACF の発症を誘導した。飼育期間終了時にマウスをペントバルビタールナトリウム溶液の腹腔内投与によりと殺し、大腸、肝臓および膵臓を採取して重量を測定した (Fig. 2)。

(8) 大腸腺腫数計測

採取した大腸を生理食塩水で洗浄し、4%ホルマリン溶液で一晩固定した。固定後、大腸を切り開いて面積を測定した後、0.1%メチレンブルーで染色し、10 倍の光学顕微鏡下にて、ACF 数を計測し、単位面積当たりでの ACF 数を算出した [24]。また、ACF を構成する AC（異常腺窩）を 1、2 および 3 個以上で分けて計測した。

(8) アポトーシス誘導評価

各群 3 匹の大腸よりランダムに ACF を含む 3 つの範囲（約 2mm²）を切り出し、常法に従って脱水し、Technobit8100（Heraeus Kulzer）のプロトコールに従い組織を包埋した後、マイクロトームを用いて 5 μm の切片を切り出し定法に従いスライドガラスに貼り付けた。

Table 1 Test feed composition (g/100g)

	control	1%yam storage protein	0.5%yam storage protein	0.5% degraded yam storage protein	Yam FD (positive control)
Cornstarch	39.7	39.7	39.7	39.7	20.0
Milk casein	20.0	19.0	19.5	19.5	20.0
α - cornstarch	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2
Granulated sugar	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Others	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0
Yam FD	-	-	-	-	28.0
Yam storage protein	-	1.0	0.5	-	-
Degraded yam storage protein	-	-	-	0.5	-

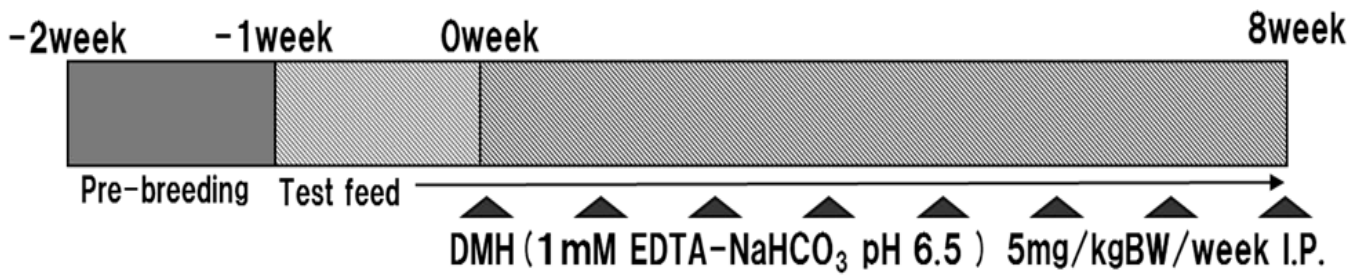


Fig. 2 Experimental schedule

アポトーシス誘導の評価は TUNEL 法を用いて行った。染色後、400 倍の蛍光顕微鏡下でスライド上の 10 箇所をランダムに写真をとり、各スライドで少なくとも 1,000 個の核を計測した。アポトーシス細胞は、DAPI および TUNEL 染色の双方が陽性の核のみアポトーシス陽性と判定し、アポトーシスの割合は写真視野中のアポトーシス陽性核数/全細胞核数で算出した。

(9) 統計処理

統計処理は、一元配置分散分析の後、Tukey の多重比較検定を行い、データは平均値±標準偏差で示した。

実験結果

1. ナガイモ塊茎タンパクの抽出と酵素的分解

ナガイモ凍結乾燥粉末 100g より抽出されたタンパク質は $4.7 \pm 0.4\text{g}$ であった。ナガイモ凍結乾燥粉末の一般成分分析では水分を除いた乾燥物の成分は糖質 72.4%、タンパク質 10.2%、灰分 4.2%、食物繊維 5.9%となっている (Table 2)。100g 中のタンパク質含量は約 10g であり、この値から考察するとタンパク質の回収率は約 50%であった。

ナガイモタンパク画分および分解物の SDS-PAGE の結果を Fig.3 に示した。ナガイモタンパク画分は、主に分子量約 31kDa のタンパクで占められていた。この結果は他の報告 [18; 28] と一致することから、抽出したナガイモタンパク画分は主に dioscorin で構成されていると考えられる。

Table 2 Composition of freeze dried yam components (g/100g)

Carbohydrate	72.4
Fiber	5.9
Protein	10.2
Ash	4.2
Moister	6.9

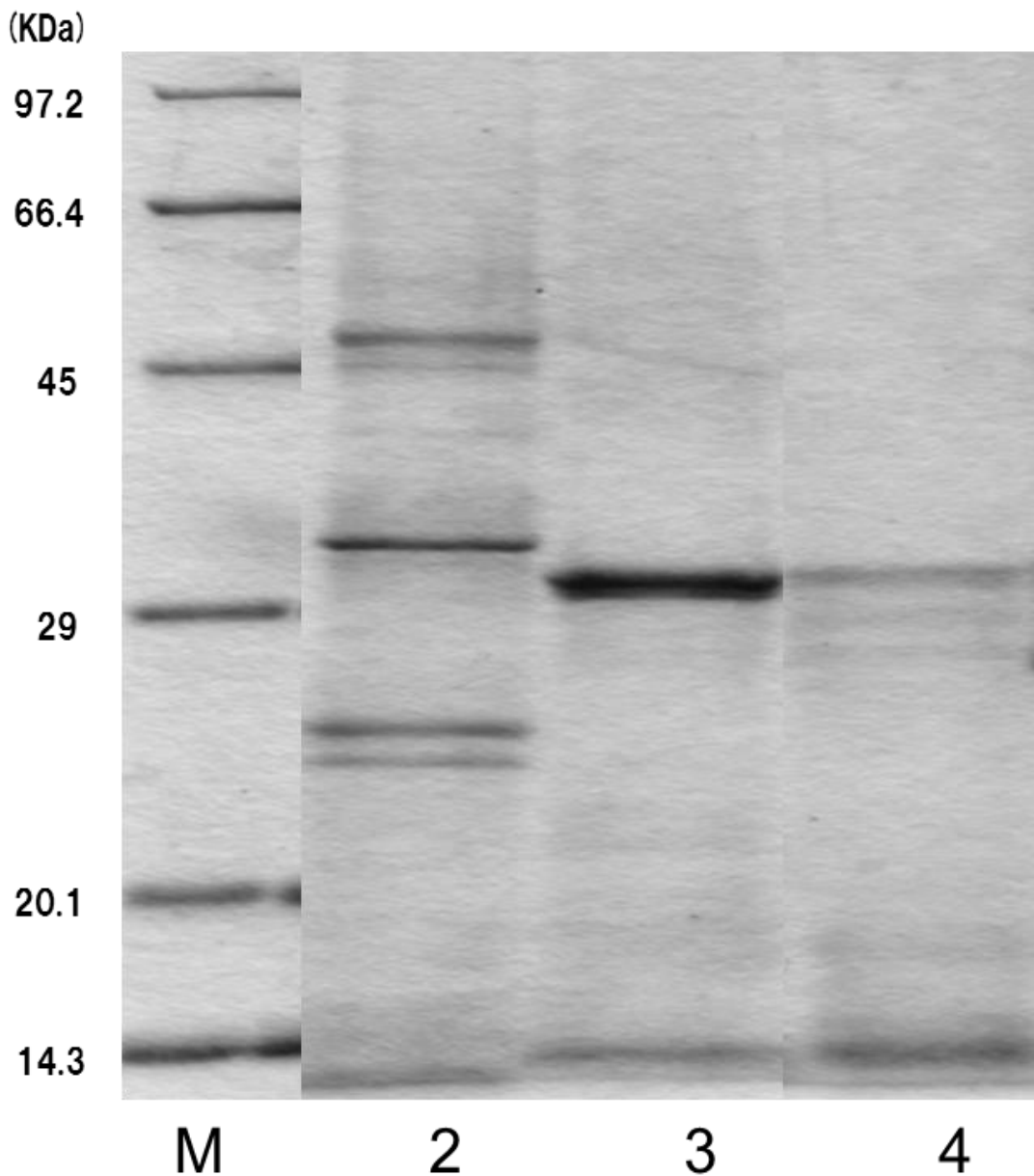


Fig. 3 SDS-polyacrylamide gels electrophoresis profiles of storage protein from Chinese yam

M, Molecular weight marker; 2, protease; 3, storage protein from Chinese yam; 4, protease digestion of Chinese yam storage protein.

プロテアーゼによる分解では 31KDa の主要なバンドの大部分の消失が確認されたが、一部残存が認められた(Fig 3).

2. 細胞増殖への影響

Caco-2 細胞培養培地への 100 μ g/ml でのナガイモタンパク画分分解物添加により、24 時間または 48 時間培養後の細胞増殖率が有意に抑制され (Fig. 4), その抑制率は 43.3% (24 時間) 43.7% (48 時間) であった. 一方、同濃度の未分解物添加では細胞数の有意な減少は認められなかった (データ非掲載). これらの結果は、経口摂取されたナガイモタンパク画分が体内の消化酵素の影響を受け、ペプチド分解されることにより大腸腺腫発症抑制効果が発現することを示唆するものであろう. また DAPI,TUNEL 共染色による核の形態観察ならびにアポトーシス陽性細胞の観察を行ったところ、ナガイモ貯蔵タンパク質分解物を添加した細胞において核の凝集や TUNEL 陽性染色を示す、アポトーシス様の細胞が確認された (Fig. 5).

3. 大腸腺腫数の測定

DMH 投与期間中、全実験群ともに 8g 程度の体重増加が認められたが、飼育期間中の体重変動、および解剖時の各臓器重量は各群間で有意な差は認められなかった.

DMH 投与マウスより摘出した大腸内部のメチレンブルー染色像を Fig に示す. 通常の大腸上皮組織は、メチレンブルーに均一に染色され一様な絨毛用の形態を示す. 一方で ACF はメチレンブルーに強く染色され、かつ肥大化した形態を示す (Fig. 6A). また ACF は変異の進行に伴い、ACF 内の AC の数が増加する (Fig. 6B). 一般的に AC 数の多い ACF が増加するほど大腸ガンが発症

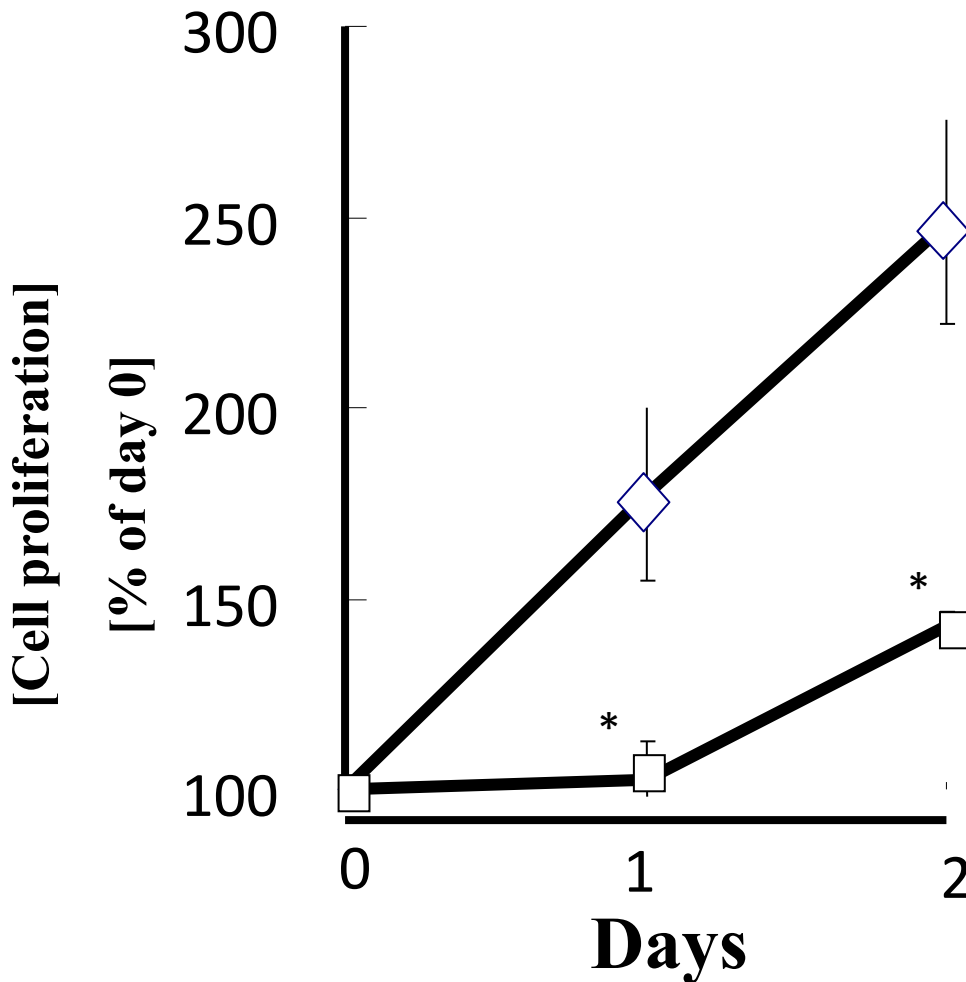


Fig. 4 Effects of storage protein digestion products on cell proliferation in Caco-2 cells

Cell proliferation [(◇, vehicle (protease, 100 mg·ml⁻¹); □, storage protein digestion products and protease, 100 mg·ml⁻¹)]. Data are presented as mean ± S.D. of 2 independent experiments conducted in triplicate.

* significant difference (p < 0.05) from the vehicle (same day).

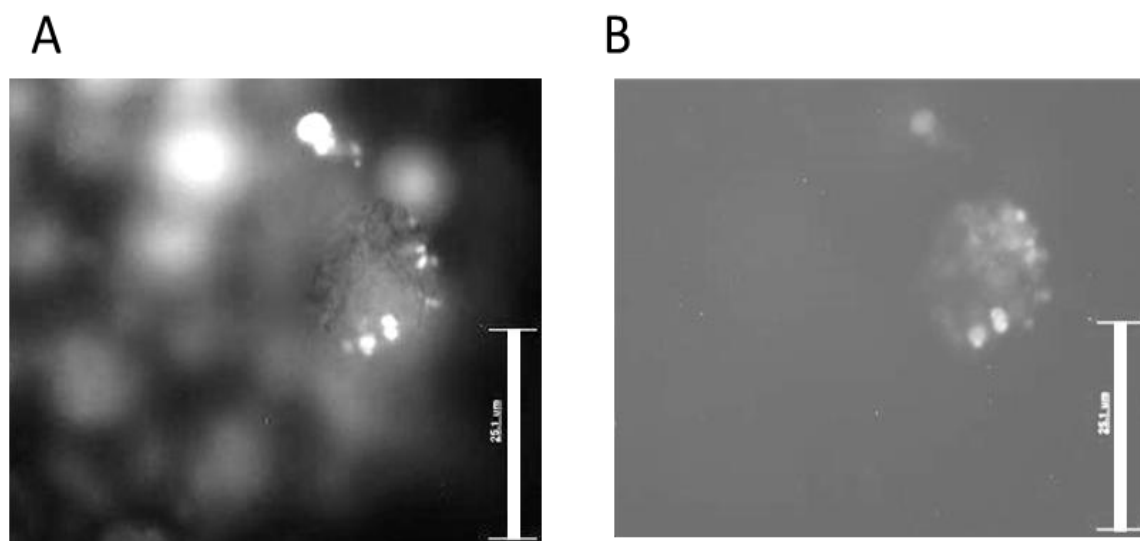


Fig. 5 Effects of storage protein digestion products on apoptosis formation in Caco-2 cells

A: Cells stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

B: TUNEL assay; The bar indicates a distance of 25 μm.

する可能性が高くなる。このため ACF 中の AC 数を測定し大腸ガン進行に与える影響の評価した。

全 ACF 数はコントロール群で 9.1 ± 2.2 個であり、ナガイモナガイモ FD 含有食では 2.8 ± 0.4 個と ACF の発症が有意に抑制されていた、一方 0.5%または 1%ナガイモタンパク画分含有食群およびでは、それぞれ 6.4 ± 0.6 個、 6.6 ± 0.4 個、 5.9 ± 0.8 個とコントロール群と比較して有意に発症が抑制され、3 群間に有意な差は認められなかったが、ナガイモ FD 群と比較して減少傾向が認められた(Fig. 7)。

ACF 中の AC 数を 1 個、2 個、3 個以上（それぞれ AC1, AC2, AC>3）に分類し計測を行った(Fig. 7)。コントロールと比較した AC1 の個数はナガイモ群以外で有意な差は認められなかったものの、0.5%ナガイモタンパク分解物群において減少傾向が認められた。一方で AC2 において 1%ナガイモタンパク画分含有食群で有意な減少、0.5%では減少傾向が、AC3 以上では 0.5%ナガイモタンパク画分含有食群および 0.5%ナガイモタンパク質分解食群で減少傾向が認められた。これらの結果より、ナガイモ塊茎貯蔵タンパク画分および分解物の投与により ACF の発症およびその進行が抑制されている可能性が示された。今回ナガイモ FD 食は木下らの報告を参照し作成したが、飼料中のナガイモタンパク量は飼料 100g あたり 2.5g と 1%ナガイモタンパク画分食よりも含量が多いことや、他の試験飼料と比較し線維量が 1%程度多いこと、ナガイモ FD 由来の他の抗腫瘍活性成分（ビタミン類やポリフェノール類など）も含まれていることから[44]これらの相乗効果などが実験に影響を与えたことと考えられる。

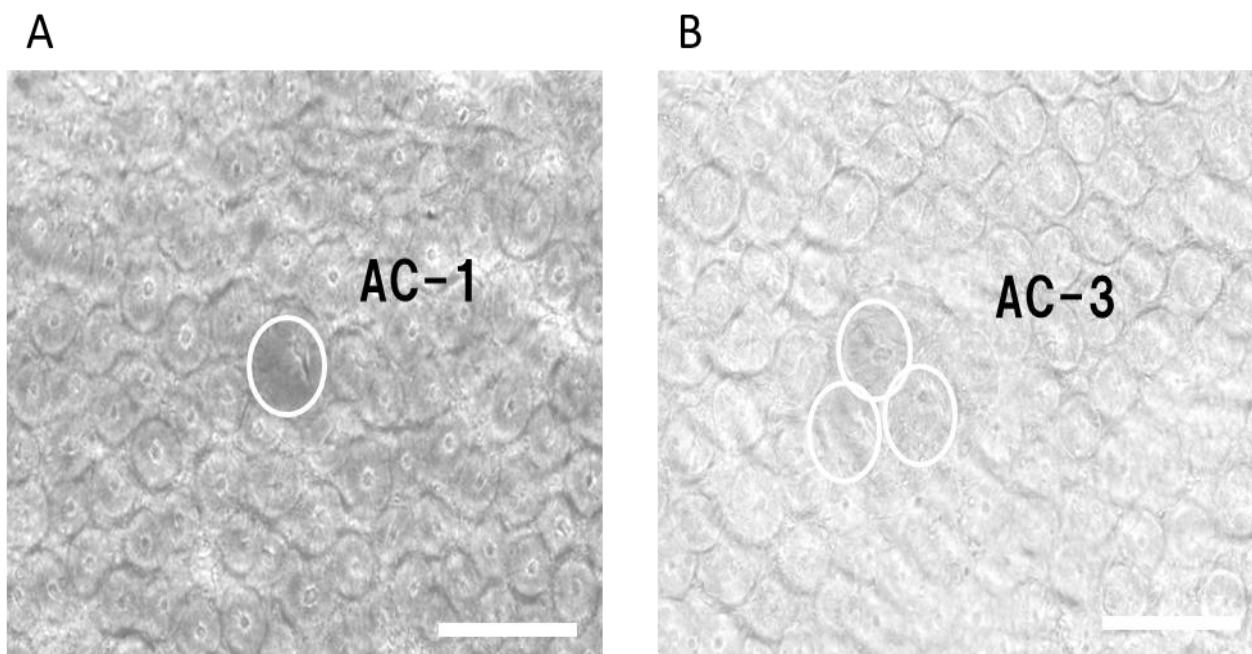


Fig. 6 Effects of dietary storage protein from Chinese yam on ACF formation in DMH-treated mice

A and B: Formation of aberrant crypt foci (ACF) induced by DMH in large intestinal villi. (indicated by circle; $\times 40$). The bar indicates a distance of 125 μ m.

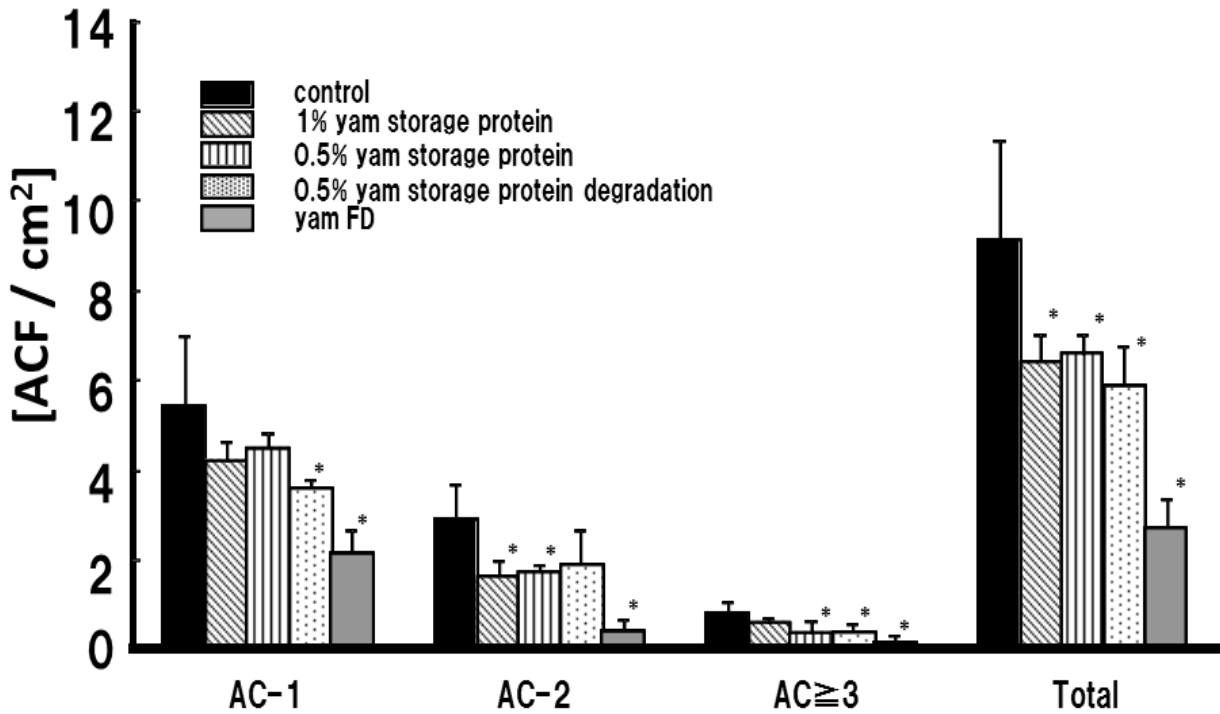


Fig. 7 Effects of dietary storage protein from Chinese yam on ACF formation and growth of AC in DMH-treated mice

Number of ACF and AC (■, control; ▨, 1% yam storage protein; ▩, 0.5% yam storage protein; ▤, 0.5% yam storage protein degradation, ■, freeze dried yam (yam FD). Data are presented as mean \pm standard deviation (S.D.) of 7 experiments. * significant differences ($p < 0.05$) from the control.

4. アポトーシス誘導評価

アポトーシス陽性と判定された核の割合はコントロール，ナガイモ FD，1% ナガイモタンパク画分，0.5%ナガイモタンパク分解物の順に，それぞれ 7.9%，17.6%，12.4%，11.3%，となり，コントロールと比較してナガイモ FD 投与では有意にナガイモ FD のアポトーシス陽性核の割合が増加した．一方 1%ナガイモタンパク画分群および 0.5%ナガイモタンパク分解物群ではナガイモ FD 群と比較してアポトーシス誘導率が低い値となったが，コントロール群と比較して増加傾向が認められた(Fig. 8, 9)．

4. 考察

大腸ガンの発症機構の一つとして，腸管上皮細胞の Wnt シグナル遺伝子伝達系が亢進し，次いで，MAP キナーゼ経路の亢進による異常増殖により ACF が発症し，最後に P53 系の破綻により大腸ガンの発症へとつながる．今回用いた DMH 投与による ACF 発症モデルマウス系はこの発症系に近い系であることが知られている [35]．

木下らの報告 [15] で，ナガイモ食を与えた DMH 投与マウスでの DNA マイクロアレイによる大腸 mRNA の発現変動の評価において MAP キナーゼ経路関連の遺伝子発現の抑制およびアポトーシス関連遺伝子の発現の亢進が確認されており，細胞の増殖を抑制するとともにアポトーシスの亢進の方向に働き ACF の抑制につながることが示唆されている．今回大腸上皮組織でのアポトーシス誘導の増加が確認され，ナガイモおよび貯蔵タンパクによる ACF 抑制においてアポトーシスが関与していることが示された．

大腸ガン発症において酸化ストレスは重要な危険因子として考えられている．

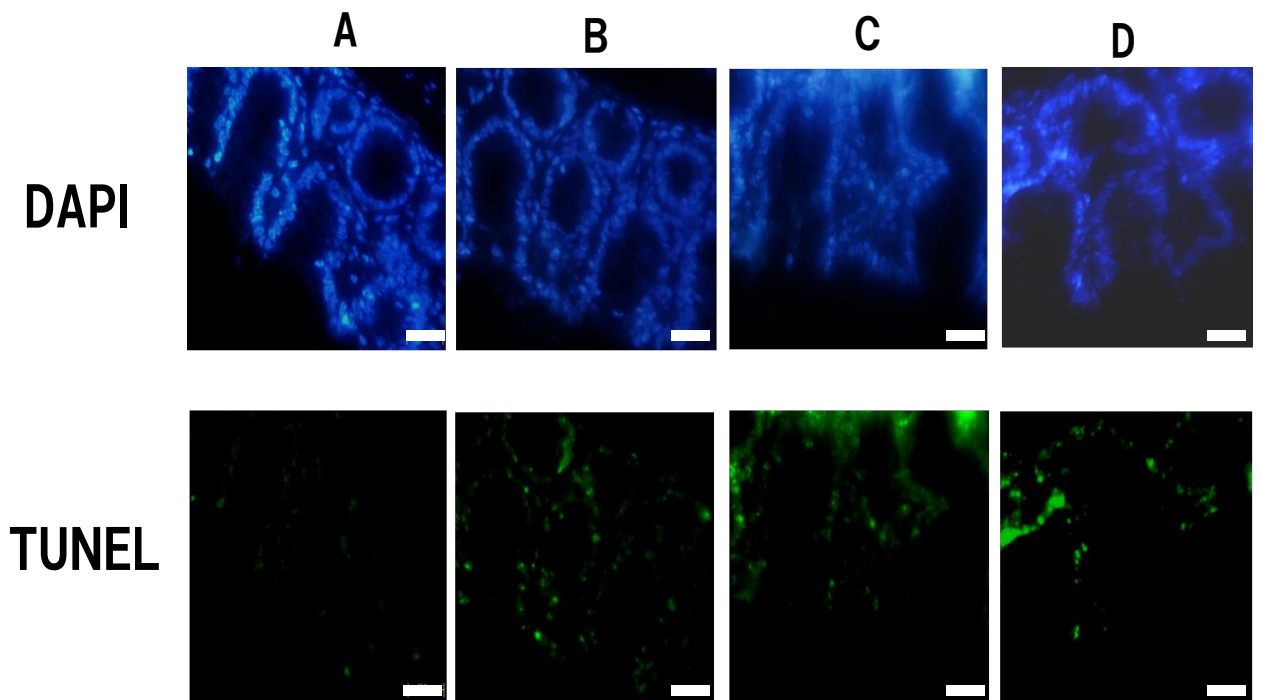


Fig. 8 Effects of storage protein on large intestinal apoptosis in DMH-treated mice

Intestines stained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and TUNEL assay. A: Control. B: 1% yam storage protein. C: 0.5% degraded yam storage protein. D: yam FD. The bar indicates a distance of 25 μ m.

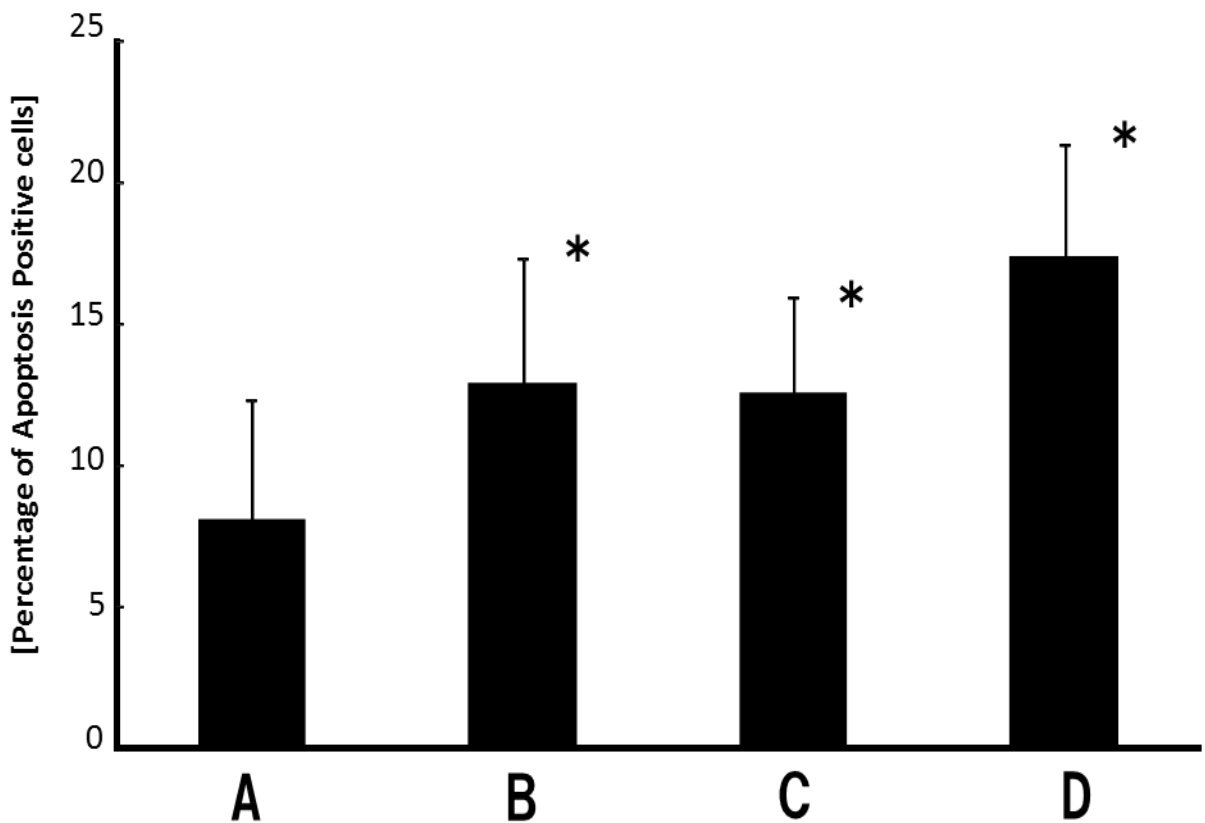


Fig. 9 The percentage of apoptotic cells on large intestinal apoptosis in DMH-treated mice.

A: Control. B: 1% yam storage protein. C: 0.5% degraded yam storage protein. D: yam FD. * significant difference ($p < 0.05$) from the control.

他の報告によると抗酸化物質の投与により発ガンが抑制され、その機序としてスーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素の活性化などが関与していることが示唆されている[45]. ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質の主要構成成分である dioscorin 自体も抗酸化活性を有することが報告されていることから、タンパク自体またはその分解物自体が抗酸化成分として体内で、酸化ストレスからの組織を保護する、もしくは体内で抗酸化酵素等の活性化を亢進する可能性も考えられる[46; 47; 48; 49].

大腸ガン予防が効果できる薬剤や食品成分には非ステロイド性消炎鎮痛剤や、ビタミン D、葉酸、カルシウムなどが報告されており、この中で作用機序が明らかなのは NSAIDS のシクロオキシゲナーゼ-2 選択阻害活性[50]、ビタミン D の P450(CYP)3A 発現誘導を介した腸管内リトコール酸の解毒作用である[51]. ナガイモに含まれるフェノール化合物類にもシクロオキシゲナーゼ-2 阻害活性が報告されている[52]が微量成分でありどの程度影響しているかは今後検討が必要である.

またダイズタンパクが難消化性のレジスタントプロテインとして働き腸管内の発ガン物質を希釈し大腸ガンの発症を予防すると報告されている[53]. 今回ナガイモ塊茎貯蔵タンパクおよびその分解物でも抑制効果が認められたことより、タンパク中のペプチド等が組織に直接的または、難消化性のレジスタントプロテインとして働き ACF の発症を抑制していることも考えられる.

また、今回供試したナガイモ FD には検出されていないが、有用な機能性成分であることが報告されているヤムイモ種塊茎に含有されるステロイドサポニン diosgenine が存在する. Diosgenine は、ガン抑制効果やガン細胞のアポトーシスを誘導することが報告されているため、今後ナガイモにも diosgenine が含まれ、同様の作用を有するのかを検討する必要がある[54; 55; 56].

今回の実験結果よりナガイモの ACF 抑制活性は、ナガイモに含まれる貯蔵タンパク質などの抗酸化成分の影響や、腸管蠕動運動の活性化や食物繊維等の難消化性物の影響による腸管内の発ガン物資の希釈化、排出の促進、免疫賦活効果などの影響とともに、フェノール化合物、ポリフェノールといった微量成分との相乗効果といった複合的要因によるものであり、アポトーシス誘導の亢進などの作用も関与していることが考えられる(Fig. 10).

本研究において著者は、ナガイモ塊茎貯蔵タンパク画分の大腸 ACF 抑制効果を実証した。日本ではナガイモは主に生食として用いられており、それを食べる機会が多いものではないが、今後機能性食品素材としての利用が期待される。また、規格外品を利活用する上で今回の知見は有用な情報を提供したと考えられる。

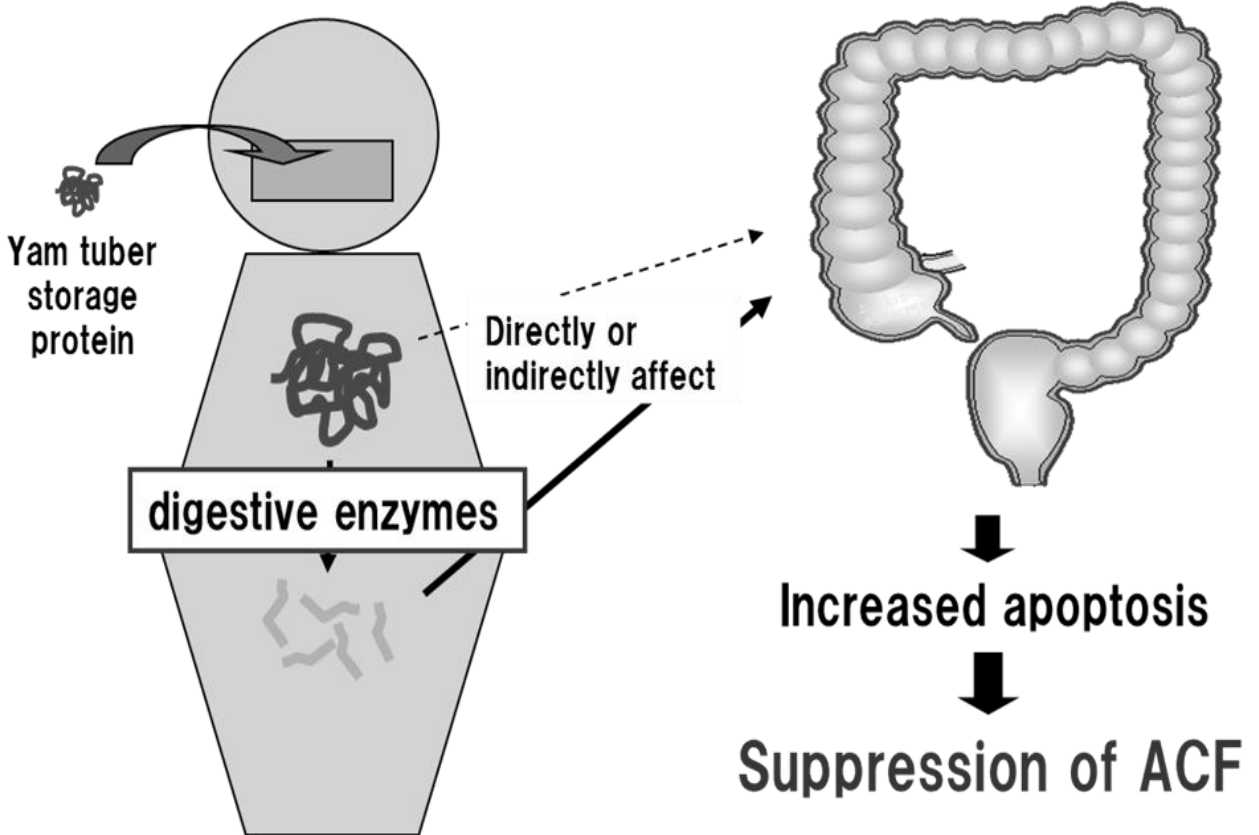


Fig. 10 Physiological effect of yam tuber storage protein (specuration)

要約

1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) 誘導性大腸腺腫発症モデルマウスにおいてナガイモ凍結乾燥物の投与が、未投与のマウスと比較して大腸腺腫の発症を有意に抑制することが報告されている。本研究では、活性本体として、多様な機能が報告されているタンパク質 **dioscorin** を主要な構成タンパク質とする、塊茎貯蔵タンパク質画分がナガイモによる大腸腺腫発症抑制効果の活性本体であると予測し、ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質を用いて、ヒト結腸がん細胞株 **Caco-2** の増殖抑制効果ならびに DMH 誘導性大腸腺腫発症モデルマウスにおける大腸腺腫発症抑制効果の検証を行った。またナガイモ塊茎貯蔵タンパク質は体内で分解されることが容易に推測することができることから、同様の実験系においてナガイモ塊茎貯蔵タンパク質のプロテアーゼ分解物の効果も検証した。

ナガイモ塊茎には乾燥物の 10% ほどのタンパク質が含まれる。本研究では水抽出によりタンパク質抽出を行い 100g のナガイモ凍結乾燥物より約 5g のタンパク質画分が調製された。タンパク質の回収率は約 50% 程度であった。また抽出したタンパク質を SDS-PAGE により確認したところ、31KDa 付近に主要なバンドが確認され、既報より **dioscorin** であることが推測された。

Caco-2 細胞培養培地へのナガイモ塊茎貯蔵タンパク質分解物添加により **Caco-2** 細胞の 24, 48 時間時点における増殖が未添加の **Caco-2** 細胞と比較して有意に抑制され、アポトーシス形態を示す細胞が確認された、一方で未分解物の添加は **Caco-2** 細胞の増殖を抑制しなかった。

DMH 投与マウスにおいて飼料中に 0.5 または 1% の割合でナガイモ塊茎貯蔵タンパク質もしくはその分解物を混合した飼料を与えたマウスでは、未投与のマウスと比較して、大腸腺腫の発症が抑制された。また大腸腺腫を構成する異常腺窩の構成数も減少傾向が認められた。しかしながらナガイモ凍結乾燥物を

投与したマウスと比較したところ、これらの値は低い結果となった。さらにナガイモ塊茎貯蔵タンパク質および分解物を投与したマウスでは大腸組織におけるアポトーシスの誘導が有意に増加した。

これらの結果より、ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質もしくはその分解物ががん細胞のアポトーシスを誘導し、大腸腺腫の発症を抑制することが示唆された。

ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質はナガイモの大腸腺腫発症抑制効果において重要な役割を有するが、この効果はナガイモ塊茎貯蔵タンパク質のみの効果ではなく、他の成分(食物繊維やステロール類など)との複合的要因により引き起こされることが推測される。

Ⅲ. デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎モデルマウスにおける

食餌性スフィンゴ脂質の効果

現在、炎症性腸疾患は現在世界中において問題視されている疾患である、この疾患は潰瘍性大腸炎とクローン病の2つの疾患が主となる疾患であり、双方ともに消化管に重度の炎症を生じ、炎症症状が重度となる活動期と軽度になる寛解期を繰り返し日常生活に多大な困難を及ぼす。2つの疾患はいくつかの特徴が異なる。潰瘍性大腸炎は大腸粘膜に糜爛様や潰瘍状の炎症が、主に大腸でのみ炎症が発症し、直腸から連続的に上行性に炎症が広がる傾向がある。発症年齢は男女ともに20代に発症しやすい傾向があるが全年齢で発症する。日本における罹患者は2008年で約11万人となっている[57]。一方クローン病は大腸だけでなく口腔にいたるすべての消化管で肉芽腫様の炎症を生じる。発症は主に10代から20代が中心となり、男女比はおおむね1:2となっている。症状は双方の疾患ともに病変に由来する腹痛、下血、これにともなる体重減少が認められる[58]。これらの疾患の原因として、食事中の成分(脂質等)への異常な免疫反応や、自己免疫反応の変化[59]、腸内細菌叢の変遷など様々な影響[60; 61; 62]が指摘されているが、その詳細は明らかとなっていない[57; 58]。治療法としては、食事療法、各種薬剤による内科的治療が中心となるが、疾患が重度の場合は外科的な処置による治療もおこなわれる。しかしながら現在の治療法では疾患が完治することはない。これらの背景より、炎症性腸疾患は現在日本において公費負担の対象疾患となっている。

完治が難しいことから、炎症性腸疾患の治療の方向性として、いかに炎症症状の活動期をおさえ寛解期を長く保つかが重要とされる。この観点並びに、発症の予防という観点から、現在様々な食事性成分の効果が研究されている[63]。

これらの報告で多く用いられる方法として、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS)の飲水添加による投与により 大腸炎症を誘発する方法が挙げられる。DSS は直接的に大腸粘膜上皮に障害を及ぼし炎症を引き起こす[64; 65; 66; 67; 68]. 本研究においても大腸炎の誘導に DSS を使用したモデル動物を使用した。

スフィンゴ脂質は細胞膜を構築する成分であり、日々摂取している食品中にも含有している[22]. 1日当たりの摂取量は GlcCer で 60~80mg, SM で 50~110mg といわれている[23; 69]. これまでにさまざまな食品に含まれるスフィンゴ脂質の含量や組成について分析されており[69; 70; 71], 植物では GlcCer やリン酸イノシトールを有している酸性スフィンゴ脂質が、動物では SM が主であるといわれている (Fig. 11). また、植物のスフィンゴ脂質と動物のものでは構成している脂肪酸とスフィンゴイド塩基の特徴が異なる[23]. 植物のスフィンゴ脂質の脂肪酸は 2 位に水酸基をもつ 2-ヒドロキシ脂肪酸が主要であり、遊離セラミドおよび酸性スフィンゴ脂質では 2,3-ジヒドロキシ脂肪酸が存在するといわれている。動物では脳や皮膚の 1 部には 2-ヒドロキシ脂肪酸も存在するが、ほとんどが水酸基をもたないノルマル脂肪酸である[72; 73; 74; 75; 76; 77]. 動物、植物由来のスフィンゴイド塩基の種類を Fig. 12 に示す。スフィンゴイド塩基の種類は植物の方が多く、8 位の二重結合にはシス型とトランス型が存在し、異性体を含めて 9 種類が確認されている。セラミドにはトリヒドロキシ塩基(t)が、GlcCer にはジヒドロキシ塩基(d)である 4,8-スフィンガジエニン(d18:2)あるいは 8-スフィンゲニン(d18:1⁸)が多い[23; 73; 74; 76; 77; 78]. 一方、動物では 8 位に二重結合を持つものは存在せず、4-スフィンゲニン(スフィンゴシン, d18:1^{4t})がほとんどである[23; 79]. また、皮膚には一部、6 位に水酸基を持つものも存在する[75; 79].

「セラミド」素材は現在、合成セラミド、動物由来の SM、植物由来の GlcCer

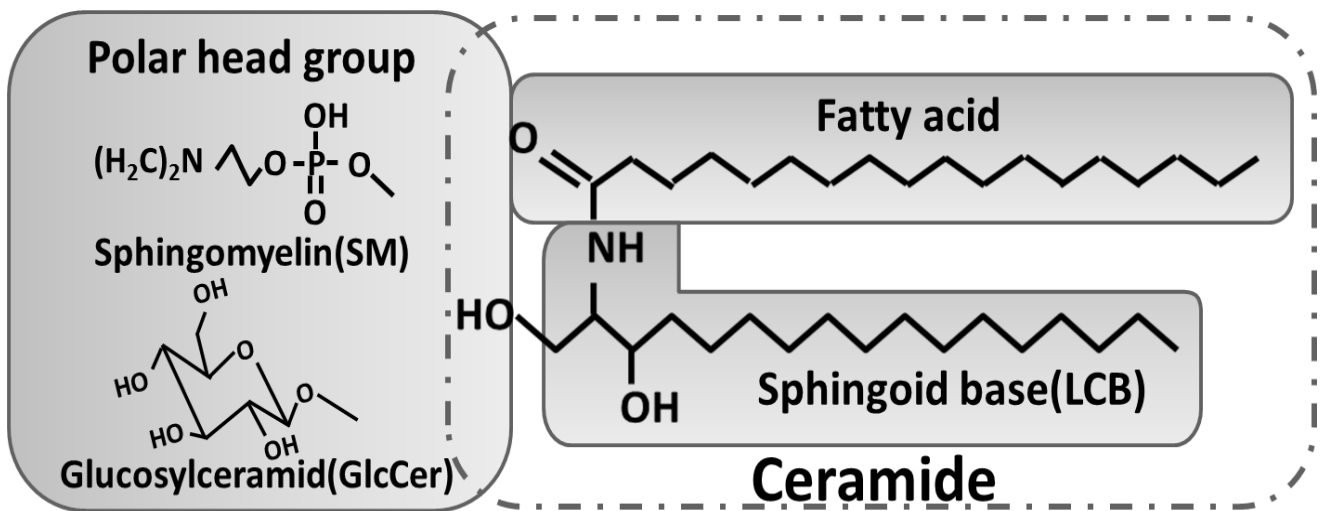


Fig. 11 Structure of Sphingolipid

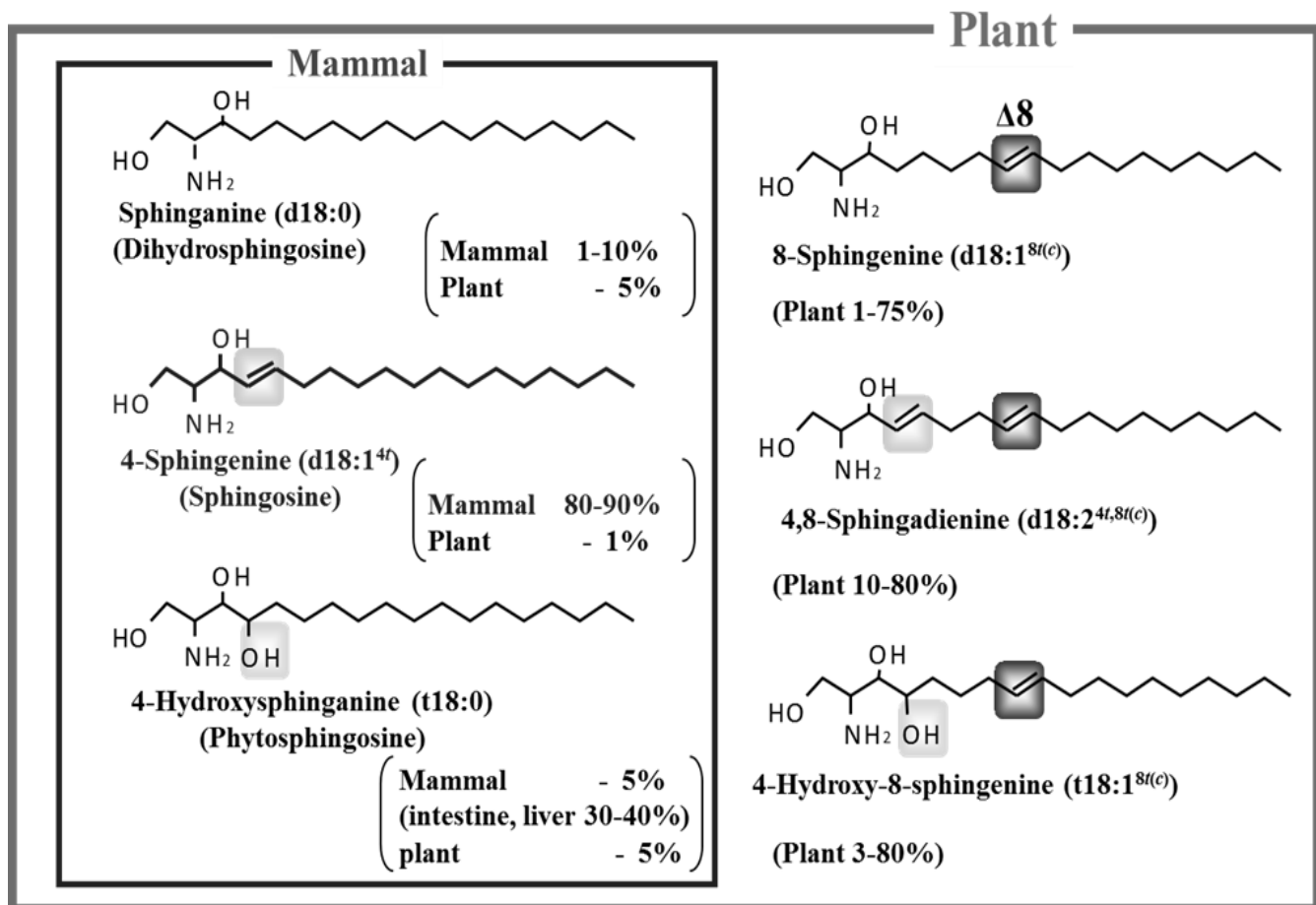


Fig. 12 Composition of sphingoid base in mammal and plant

が上市されているが、合成セラミドは食経験がなく、また動物性のものは BSE やトリインフルエンザなどの感染の危険性から、現在市場に出ているものほとんどが植物由来の「セラミド」である。これら以外の素材として、原料の入手しやすさや安全性などからリンゴの搾汁残渣などの加工副産物が注目されている [59].

経口摂取スフィンゴ脂質の炎症に対する効果として、植物由来の GlcCer の摂取による皮膚への効果がこれまでに多数報告されており [25; 80; 81; 82], 特に皮膚の病気として患者数の多いアトピー性皮膚炎に対する効果が多く報告されている (Table 3). このように炎症に効果があるという背景から、本研究では、免疫に大きな役割を持つ腸管での炎症に対するスフィンゴ脂質の効果を検討した。植物と動物のスフィンゴ脂質はその組成の特徴の違いから腸管での動態が異なると考えられており、そのために作用機序や効果の程度が異なると考えられる。

Table 3 Functionality of Sphingomyelin and Glucosylceramide

	SM	GlcCer
Skin moisturizing	Haruta <i>et al.</i> , <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 72, 2151 (2008)	Tsuji <i>et al.</i> , <i>J. Dermato. Sci.</i> , 44, 101 (2006)
Anti aberrant crypt foci effect	Dirck L. Dillehay <i>et al.</i> , <i>J. Nutr.</i> , 124, 615 (1994)	Aida <i>et al.</i> , <i>J. Oleo. Sci.</i> , 54, 45 (2005)
Inhibition of cholesterol absorption	Sang K. Noh and Sung I. Koo <i>J. Nutr.</i> , 134, 2611 (204)	Hse Duivenvoorden <i>et al.</i> , <i>Am. J. Clin. Nutr.</i> , 84, 312 (2006)
Improvement of allergic effect	?	Hajime Kimata, <i>Prdiatric Dermatology.</i> , 23, 386 (2005)
Immunopotentative effect	Nihon kefir Co., Ltd. (JP-A-Hei 6-211668)	Nippon Flour Mills Co., Ltd. (JP-A-2006-328041)
Anti-dementia effect	Snow Brand Milk Products Co., Ltd (JP-A-2003-146883)	Ono <i>et al.</i> , <i>Eur. J. Lipid Sci. Technol.</i> , 112, 712, (2010)

実験方法

(1) コーン由来 GlcCer ならびに鶏皮由来 SM の調製

コーン由来の GlcCer は、日本製粉株式会社からセラミド素材として入手したものを、既報に従って研究室で精製した。すなわち、GlcCer 素材をアセトンで冷却遠心分離し、グリセロ糖脂質・ステロールグリコシド(SG)および GlcCer の混合物の沈殿。その後、沈殿にエタノールを添加して遠心分離し、エタノール可溶の GlcCer とエタノール不溶の SG に分離した。可溶部をロータリーエバポレータにかけて乾固し、実験で使用した GlcCer を得た。鶏皮由来 SM は、丸大株式会社より入手した鶏皮粉末から抽出・精製したものを使用した。鶏皮のリン脂質画分を 10ml/g のアセトンで攪拌して単純脂質と水分を除去し、得られた沈殿物に対しヘキサン-アセトン(7:3, v/v)12ml/g を加え、0℃、1,865×g で 15 分間冷却遠心分離にかけてグリセロリン脂質と水分の除去を行った。得られた沈殿物はデシケータ内で加熱乾固させ、0.5N NaOH 水溶液 10ml/g を添加して 37℃で 2 時間、インキュベーションして弱アルカリ分解によりグリセロ脂質の分解を行った。次に、50% H₂SO₄ 水溶液で pH を 1 にし、37℃で 1 時間、インキュベーションして酸分解によりプラズマローゲンの分解を行った、その後、4N NaOH 水溶液で中性にし。Folch 分配（クロロホルム：メタノール：水＝8:4:3）にかけて水溶性成分の除去を行った。下層に理論上層（クロロホルム：メタノール：1%KCl 水溶液＝3:48:47）を加えて再度水洗し、TLC で糖発色が無くなるまで水洗を繰り返した。その後、乾固した下層に酢酸エチル 10ml/g を添加して、4℃で 15 分間の遠心分離を 2 回行なって残存遊離脂肪酸や単純脂質の除去を行った。得られた沈殿物に対しアセトン 10ml/g を添加して、4℃で 15 分間の遠心分離を 2 回行い、糖セラミドの除去を行なって沈殿物をデ

シケータ内で乾固し，SM画分として実験に使用した[83].

(2) 実験動物

Balb/c Jc,マウス雌 4 週齢を日本クレアより購入した. マウスは購入後プラスチック製ゲージ(5 匹/1 ゲージ), 飼料として市販試料 CE-2(日本クレア)を与え飼育した. 飼育室は 22 度恒温, 湿度 60%, 12 時間明暗周期の条件とした. 飼育期間中の飼料, 飲用水の摂取は自由摂食とした.

(3) 動物実験

試験飼料は AIN-76(日本クレア)を基本飼料とし, GlcCer または SM を飼料の 0.1%(w/w)で添架した飼料を作成した. 大腸炎の誘導は通常飲水中に 2%(v/v)で DSS を添加した飲用水の投与により誘導した, 飼育群は DSS 飲水を与え AIN-76 基本飼料, 0.1%GlcCer, 0.1%SM を与える, それぞれコントロール群, GlcCer, SM. また DSS を与えず基本飼料を与えるブランク群を設けた(Table 4). 飼料のマウスを平均体重が等しくなるように 10 匹ずつに分類し, 少なくとも 1 週間の順化期間ののち, DSS 投与の 3 日前から試験飼料を投与し 14 日目まで投与した. DSS は 0-14 日目まで投与した(Fig. 13). 飼育期間中は毎日体重の変動を測定し, 便中鮮血反応を計測した. 各群 5 匹ずつ後述の大腸粘膜組織中のサイトカイン発現のアレイ解析のために DSS 投与 5 日目に, 他の個体は 14 日めに, マウスを屠殺し, 速やかに大腸を取り出し, 長径を測定後に内容物を洗浄し, 大腸近位部の一部をタンパク質抽出のために採取し, 他の大腸を長軸方向に切り開き, ホルマリン固定により保存した.

Table 4 Experimental groups

Group	Test Feed	DSS
Control	AIN-76 diet alone	+
SM	AIN-76 diet + 0.1% SM	+
GlcCer	AIN-76 diet + 0.1% GlcCer	+
Blank	AIN-76 diet alone	-

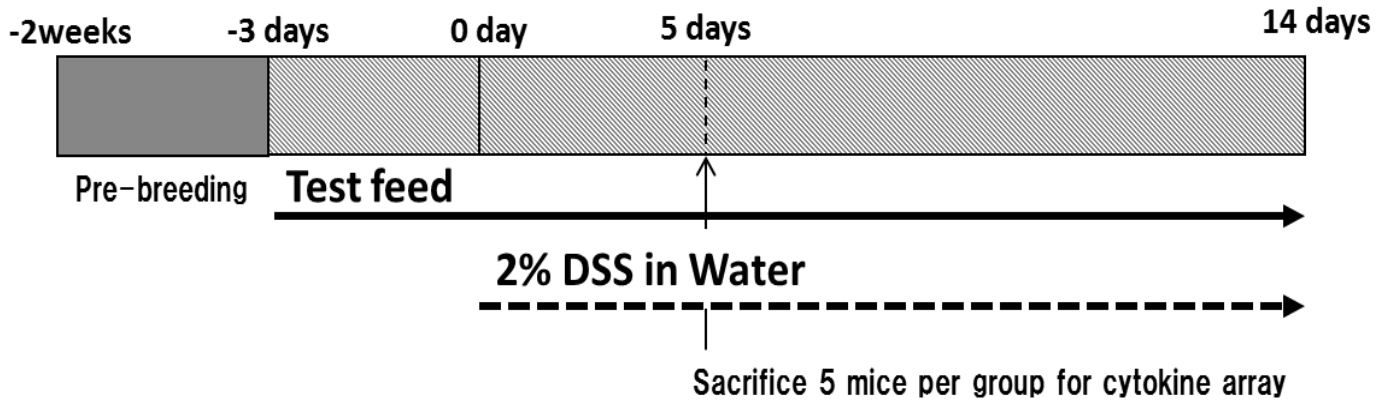


Fig. 13 Experimental schedule

(4) 大腸粘膜組織の観察

ホルマリン固定した大腸の一部をランダムに切り出し定法に従い脱水処理を行った後に、Technobit8100(Heraeus Kulze japan)を製造元の説明書を参照し、包埋処理を行った。包埋後、ミクロトームを使用して $3\mu\text{m}$ の薄片にしてスライドガラスに張り付けたのち、トルイジンブルーによる染色を行い粘膜組織の状態を観察した。

(5) 大腸ミエロペルオキシダーゼ(MPO)のウエスタンブロット解析

大腸組織に Isogen(日本ジーン)を加えホモジェナイズした後、製造元の説明書にしたがい、大腸組織からタンパク質を抽出した。抽出したたんぱく質の濃度を DC protein assay kit(R&D)により測定し各群のタンパク質を等濃度になるようにプールした後に、SDS-PAGEにてタンパク質を泳動した後に、ニトロセルロースメンブランに転写し、一次抗体に anti-myeloperoxidase antibody (Gene Tec Inc.)を使用し ECL plus Kit (GEヘルスケア・ジャパン)を使用して検出を行い、フィルムに感光した後、陽性バンドを ImageJ (NIH)を使用して解析を行った。結果は blank 群の値を基準とした時の、各群の陽性バンドの画素数を比較した。

(6) 大腸粘膜組織におけるサイトカイン発現のアレイ解析

DSS 投与 5 日のマウスより採取した大腸組織より、粘膜組織を単離した後、プロテアーゼ阻害剤、終濃度 1% Triton-X100 を含む PBS に溶解し、凍結融解

法による，タンパク質の抽出を行った．その後，Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Panel A (R&D Systems)を使用し，製造元の仕様書に従い，サイトカインアレイを行った．得られた結果は，Image J (NIH) を使用して，製造元の仕様書に従い解析した．

(7) 統計解析

データは Mean±S.E.M で表した．結果は ANOVA ののち tukey test により有意差検定を行った． $P < 0.05$ のとき有意と判定した．

実験結果

1. マウス大腸炎炎症症状に与える影響

マウスの平均体重は DSS 投与 3 日目までに各群共に上昇した．3 日目以降コントロール群では体重が減少したが，スフィンゴ脂質投与群では最長 6 日目まで体重減少が有意に抑制された (Fig. 14)．なお試験食順化期間および DSS 投与 3 日目までの摂食量に各群間での有意な差は認められなかった．便中の潜血反応はいずれの群においても 3 日目に初観測され以降は炎症症状の悪化に伴い肛門周囲での出血も確認された．

2. 解剖時組織所見

DSS により大腸炎を誘発したマウスの大腸は一般的に健常なマウスと比較して短縮することが知られている．今回の実験では解剖時の大腸長径はいずれの群においても blank 群と比較して DSS 投与群では短縮化していたが，DSS 投

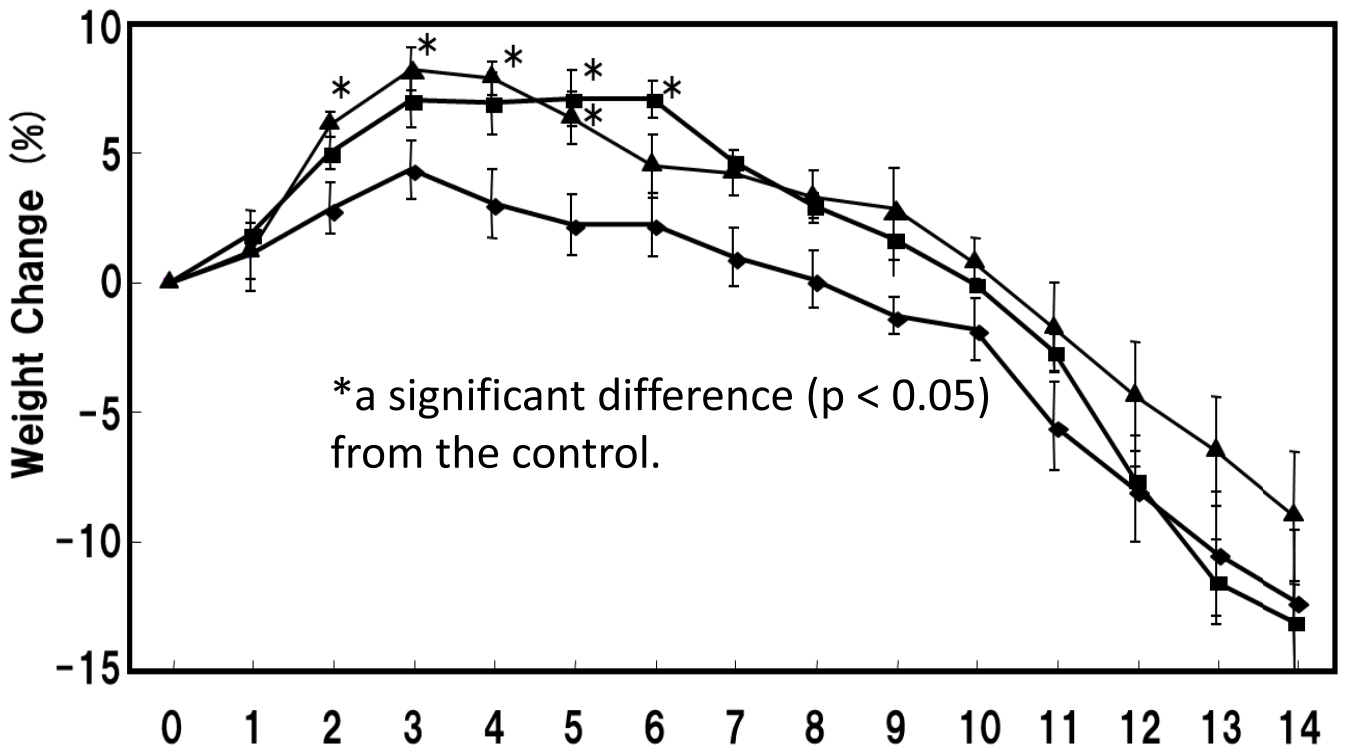


Fig. 14 Body weight change in DSS treatment period

◆: control, ■: GlcCer, ▲: SM. Data are shown as mean \pm SEM.

* significant difference ($p < 0.05$) from the control.

与群間での差は認められなかった(Fig. 15, Table 5). また脾臓重量は炎症の重症化の指標の一つとなり, 炎症により増加したリンパ球の影響を受け, 炎症状態のマウスでは重量が増加することが知られているが, 脾臓重量に関しても blank 群と比較して DSS 投与群で増加していたが, DSS 投与群間では有意な差は認められなかった(Table 6). 大腸粘膜組織はスフィンゴ脂質投与により, 炎症に伴う組織障害の緩和が確認された(Fig. 16).

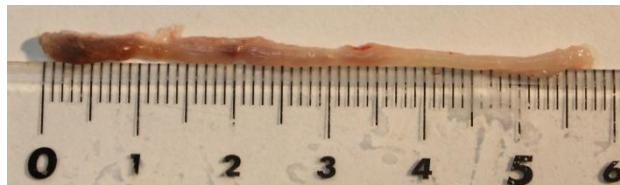
3. 大腸 MPO のウエスタンブロット解析

MPO は白血球のうち最も体内に存在する数の多い好中球に多く存在する酵素. であり, 過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸を生成する反応を触媒する. これを利用し好中球は組織に浸潤した細胞を貪食した後, 細胞内で殺菌を行う. 好中球は免疫応答において, 比較的炎症反応の初期に働く免疫細胞であるため炎症初期の指標として今回は測定した. ウエスタンブロットの結果は健全な blank 群と比較して, DSS により炎症を誘発したコントロール群では MPO の値が有意に上昇することが示された. 一方で両スフィンゴ脂質を投与した群では DSS 誘導性の炎症による MPO の上昇がコントロール群と比較して半分程度に低下し, 有意に抑制されていることが示された. また, この値は GlcCer 群と SM 群間での有意な差は認められなかった(Fig. 17).

4. 大腸粘膜組織における各種炎症性サイトカイン発現の解析

今回使用したキットでは 40 種類のサイトカイン類の解析が可能であった

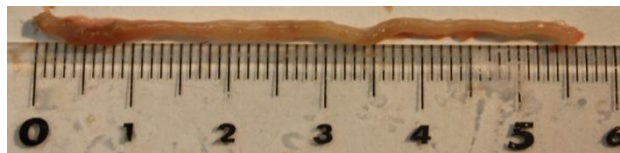
Control



GlcCer



SM



Blank

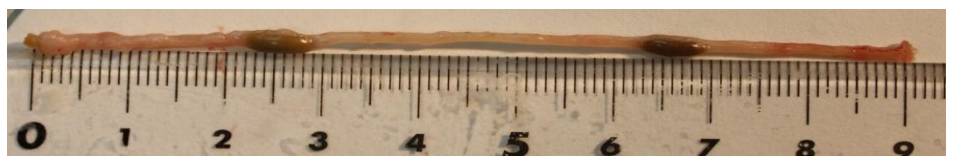


Fig. 15 Picture of large intestine at day 14.

Table 5 Colon length at end of experiment

	Length (cm)
Control	6.28 ± 0.44*
GlcCer	6.05 ± 0.46*
SM	5.97 ± 0.25*
Blank	8.8 ± 0.57

means ± S.D. *: $p < 0.05$ vs. Blank

Table 6 Spleen and liver mass at end of experiment

	Spleen	Liver
Control	8.0 ± 2.9*	58.9 ± 15
GlcCer	8.5 ± 3.5*	63.8 ± 11
SM	10.2 ± 2.8**	62.6 ± 11
Blank	4.0 ± 0.4	57.4 ± 6

means ± S.D. *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ vs. Blank

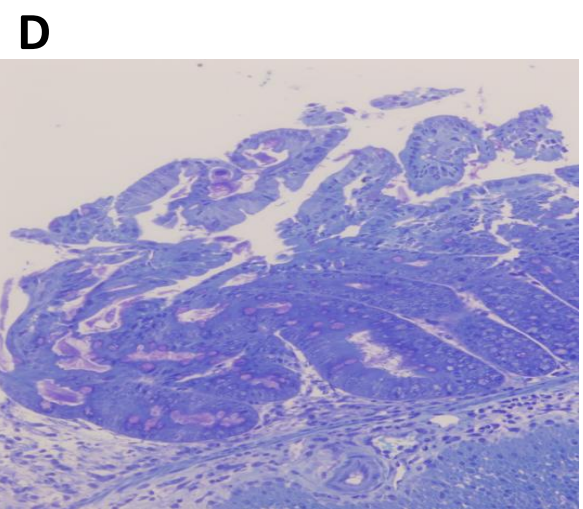
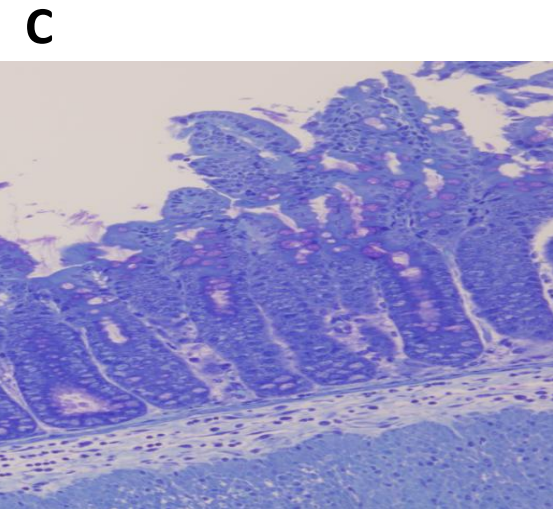
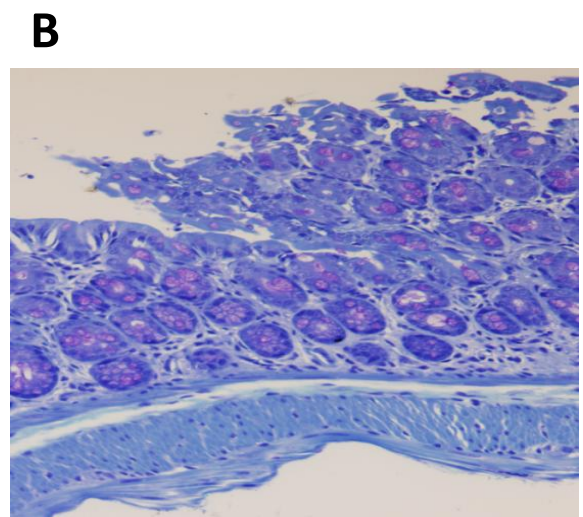
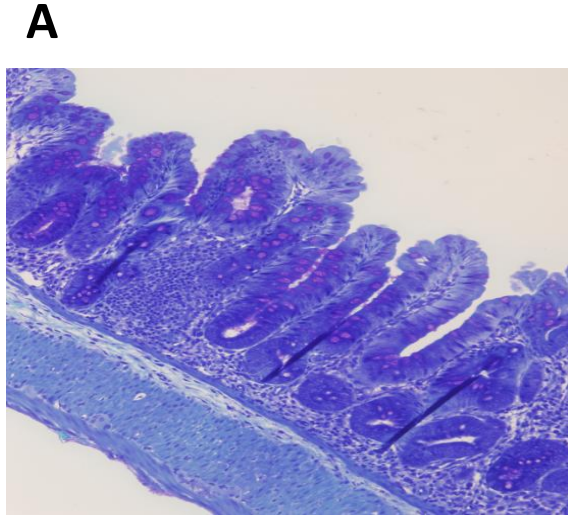


Fig. 16 Representative histological section of colon
A: blank, B: Control, C: GlcCer, D: SM. Toluidine blue Staining.
Original magnification X 10.

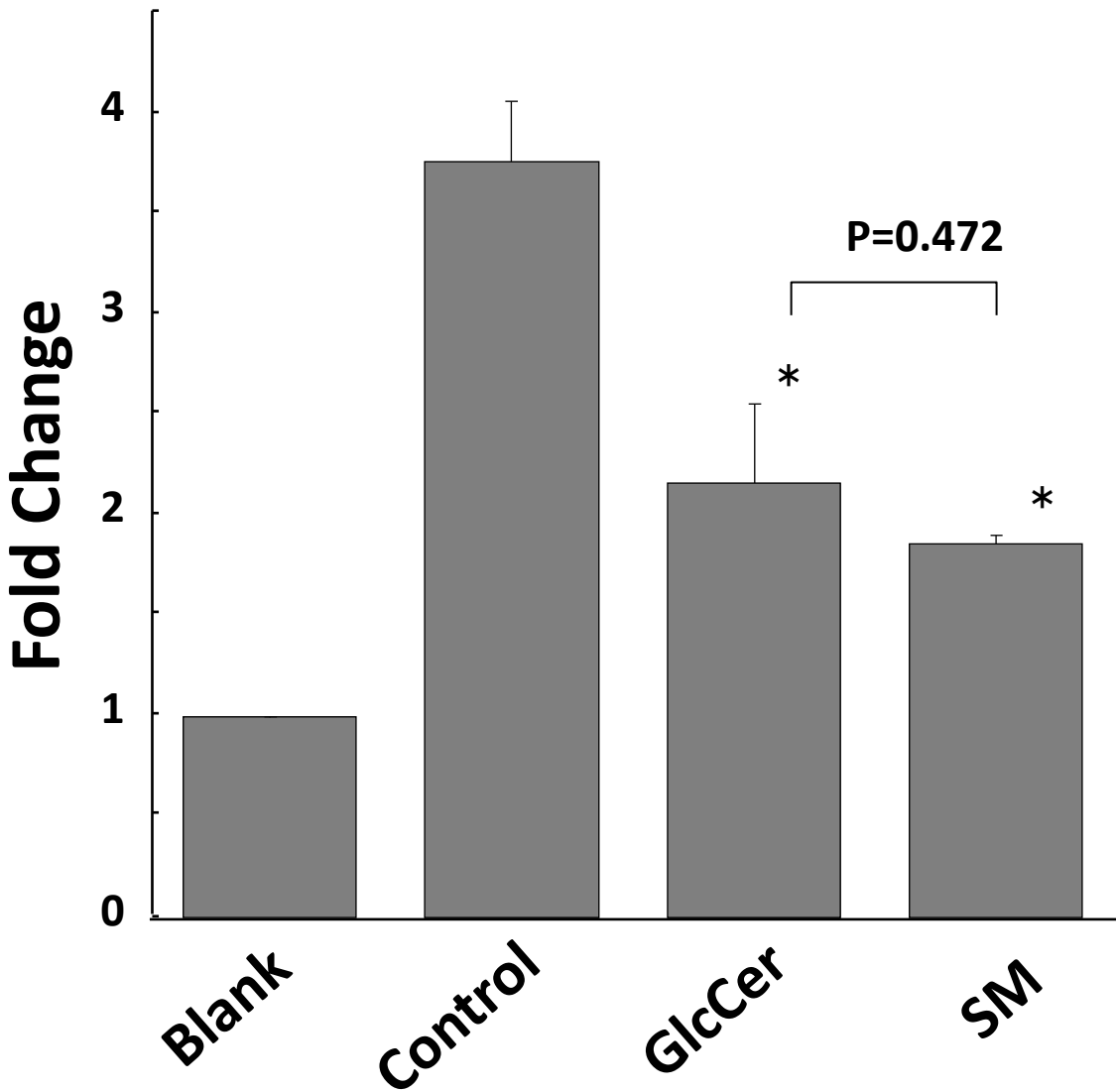


Fig. 17 Western blotting result for myeloperoxidase in colon tissue.

Data are shown as relative value with blank and mean \pm SD .

* significant difference ($p < 0.05$) from the control.

(Table 7). アレイ解析の結果は、DSS 未投与の blank 群と比較して、DSS のみを投与した Control 群では多くのサイトカインにおいて発現の上昇が認められた。一方でスフィンゴ脂質を投与した SM, GlcCer 群では、Rantes を除いたすべてのサイトカインにおいて、blank 群と比較してサイトカイン発現の減少、または、変化しないことが認められた (Fig.18)。また、両スフィンゴ脂質群と Control 群を比較すると IL-1 α , IL-1 β , sICAM-1, C5/C5a, BLC, TIMP-1, MIG, I-TAC, IP-10, IL-16 の発現減少が認められた。また、この結果は両スフィンゴ脂質群間において有意な差は認められなかった。

考察

今回の研究ではスフィンゴ脂質の投与により体重の減少が DSS のみを投与したコントロール群と比較して 2 日目から 6 日目の期間にて有意な抑制が確認された。DSS 投与による炎症反応は DSS 投与 2 から 3 日目かけて始まることが知られている。今回の研究の結果は体重減少の開始がこの期間よりも遅れて始まったことから、スフィンゴ脂質の投与により炎症の開始が遅れるのではないかと示唆される。この結果は炎症の初期に認められる好中球の浸潤の指標となる MPO のウェスタンブロット解析の値が、コントロール群と比較して両スフィンゴ脂質投与群において減少したという結果とも合致している。

さらに大腸粘膜組織におけるサイトカイン発現のアレイ解析より、スフィンゴ脂質の経口投与によって、炎症の中心的な役割を担う IL-1 α , β ならびに、好中球遊走にかかわる C5/C5a, 活性化した T 細胞の遊走にかかわる MIG, IP-10, I-Tac, IL-16, B 細胞遊走に関与する BLC, 炎症時における結合組織の線維化に関与する TIMP-1, 各種炎症性細胞の炎症部位への浸潤に関与する

Table 7 Target cytokines in this experiment

Chemokine	Inflammatory cytokine	Anti-Inflammatory cytokine	Others
C5/C5a	IL-12 p70	IL-4	M-CSF
TARC	IL-13	IL-10	GM-CSF
SDF-1	IL-7	IL-27	G-CSF
RANTES	IL-6	IL-1 ra	sICAM-1
MIP-2	IL-5		TIMP-1
MIP-1 β	IL-3		TREM-1
MIP-1 α	IL-2		
MIG	IL-1 α		
MCP-5	IL-1 β		
JE	INF- γ		
KC	TNF- α		
I-TAC	IL-23		
IP-10	IL-17		
BLC	IL-16		
Eotaxin			
I-309			

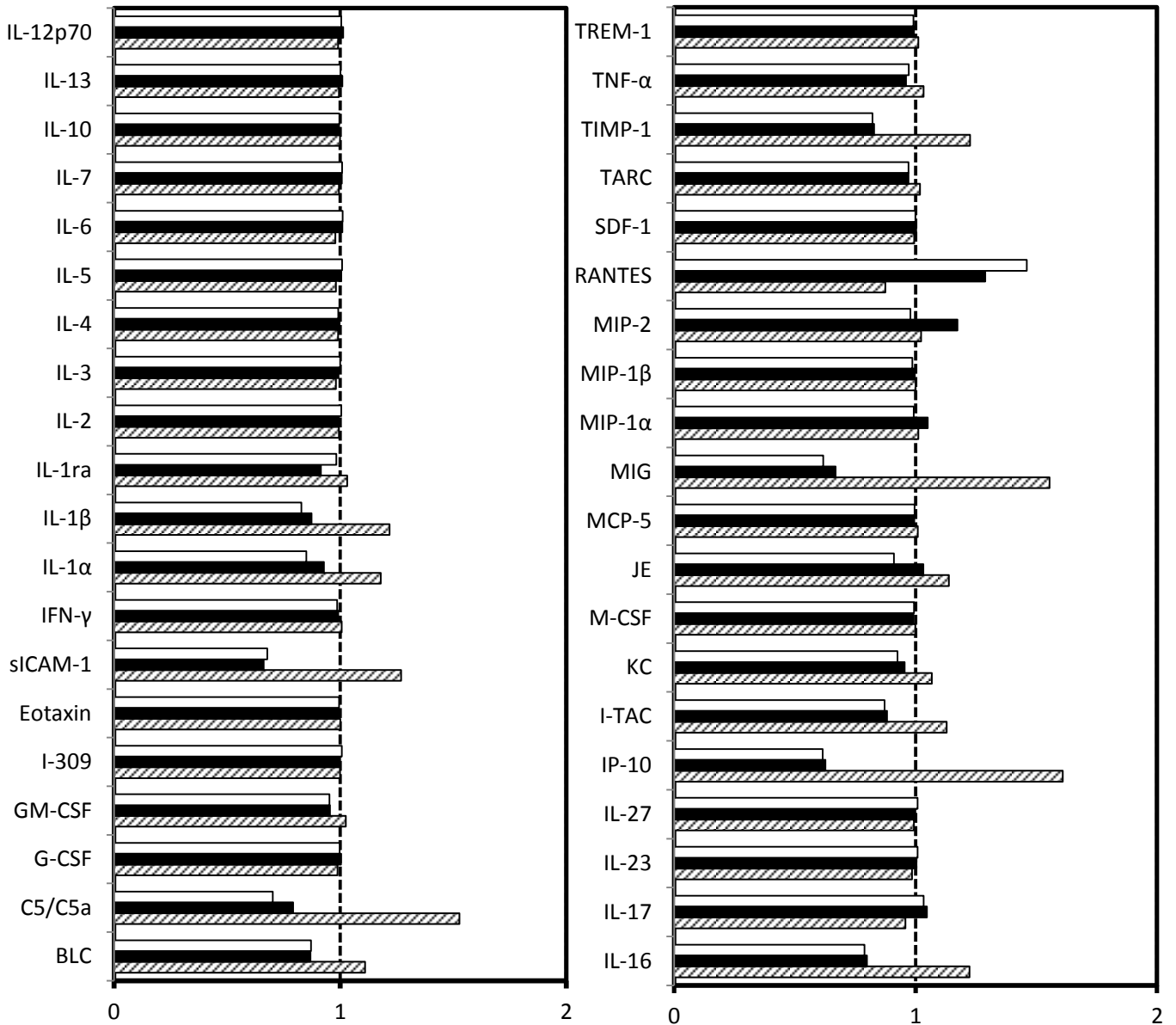


Fig. 18 Ration of cytokines level in colon mucosa.

Date are shown as relative vale with blank(---). □: CMH, ■ : SM, ▨: Control.

sICAM-1, といった各種サイトカイン, ケモカイン類の発現が抑制されていることが明らかとなった (Fig. 19). これらの結果は炎症初期における炎症性細胞の遊走を抑制していること示唆し, このことは, スフィンゴ脂質の経口投与が炎症の初期において炎症を抑制しているということを支持する結果となった.

一方で, 大腸炎症の重症度の指標となる腸管長径の短縮化においてはコントロール群と比較して両スフィンゴ脂質投与群で有意な差は認められなかった. この理由として考えられるのが, まず一つ目が, 今回の実験系は DSS を常時投与するという方法をとっており, 常に DSS による侵襲がなされているという, 非常に影響の大きい実験系をとっているためだと考えられる. もう一点が, 14 日間という比較的長期間の投与期間を設けたためだと考えられる.

スフィンゴ脂質と大腸炎症に関する報告は SM の効果を検証した物が過去に報告されている. Furuya ら [27], Mazzei ら [84] は炎症を誘発したマウスへの SM 投与により炎症症状が改善したと報告している. 一方で Fischbeck ら [26] は SM の投与は炎症状態のマウス腸管上皮細胞においてアポトーシス制御因子であるカゼプシン D の働きを促進し, 上皮細胞のアポトーシスを誘導することにより炎症を促進させるということを報告している. これに関してだがセラミドはがん化した細胞に対してアポトーシスを誘導することが知られており, ジメチルヒドラジン投与により大腸腺腫を誘発したマウスにおいて, がん細胞のアポトーシスを誘導して大腸腺腫の発症を抑制することが報告されている. しかしながらスフィンゴ脂質のセラミドおよびその分解物であるスフィンゴイド塩基は正常状態の細胞ではアポトーシスの誘導は引き起こさないことも報告されている. 現在までのところ炎症状態の細胞に対してアポトーシスを引き起こすのかについての報告はなく今後検討する必要がある. 一方で GlcCer の大腸

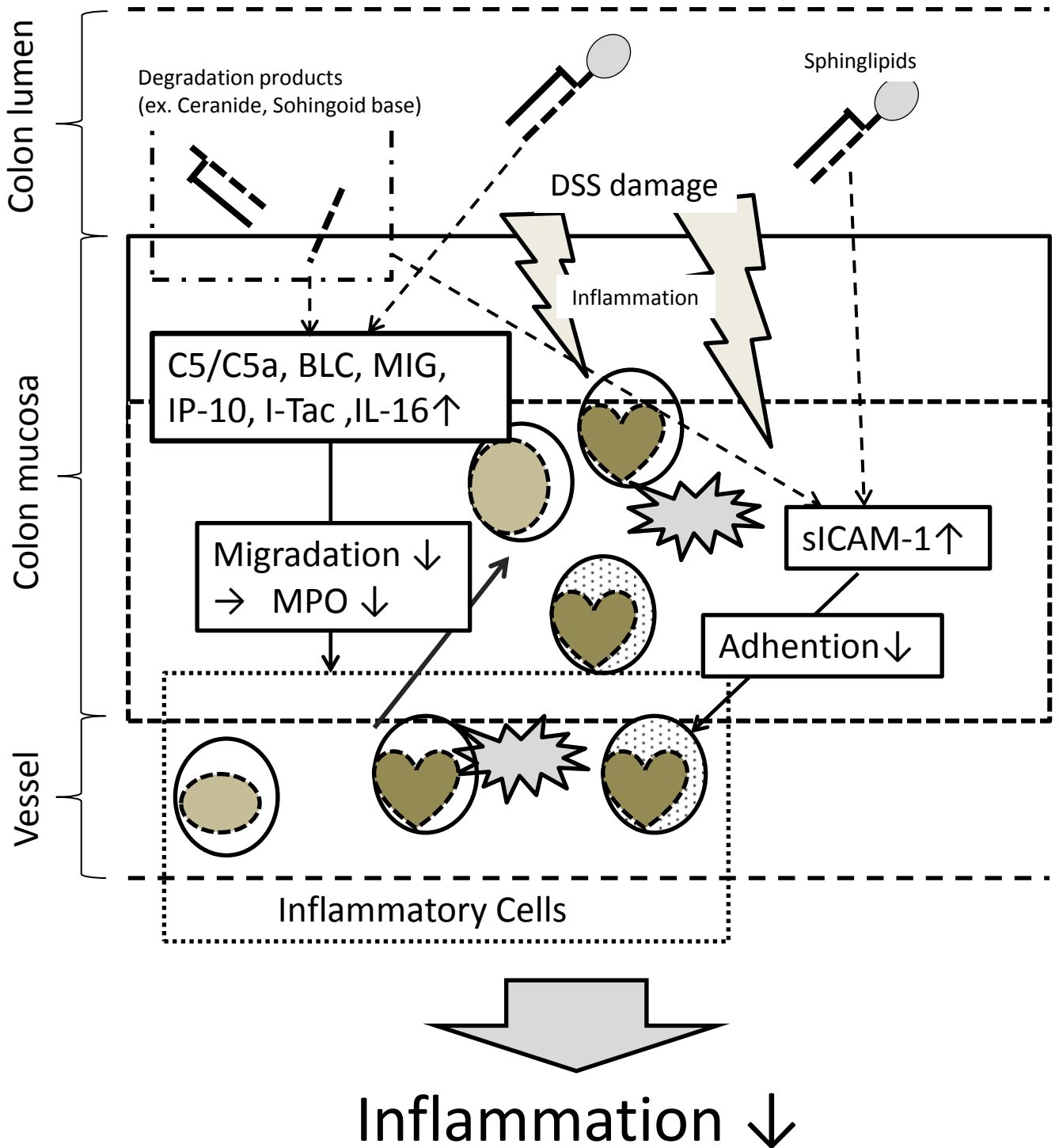


Fig. 19 Physiological effect of sphingolipids (speculation)

炎症に対する効果に関しては真菌由来の 9 - メチルスフィンガジエニンを有するセレブロシドの DSS 誘導大腸炎マウス腔内投与により T 細胞の増殖やアポトーシスを調節することにより炎症を改善するということが報告されているが、植物型のスフィンゴ脂質の経口投与による効果に関する報告は現在までになされていない。

経口により摂取されたスフィンゴ脂質は小腸の消化酵素ならびに大腸の腸内細菌の影響を受けセラミドからスフィンゴイド塩基と脂肪酸にまで分解されることが知られている。しかしながら、未分解の状態ならびに分解された状態、双方ともに生体内にほとんど吸収されることがなく [85]、大部分が便とともに排出される。このため腸管の内腔において何らかの影響、たとえば腸内細菌叢への影響やミセル化の形成による有害物質の排出などが推測されるが、この点に関しては今後さらなる検討が必要である。

植物と動物のスフィンゴ脂質はその組成の特徴の違いから腸管での動態が異なると考えられており、そのために作用機序や効果の程度が異なると考えられている。今回の結果では DSS 投与マウスにおける効果に関して SM, GlcCer 間で大きな違いは認められなかった。本章の始めに述べたとおり、この二つの大きな違いとして構成スフィンゴイド塩基の違いが挙げられるが、今回の結果からは両スフィンゴ脂質の構造の違いは、炎症の抑制効果に影響を与えないのではないかと推測される。

本研究から SM, GlcCer とともに大腸炎症の初期状態において炎症の誘発を抑制するという結果が得られたが、DSS 誘導性大腸炎を含む大腸炎症モデル動物系を用いた実験では、動物種、飼育環境、腸内細菌叢の分布といった様々な影響を受けるため、効果の詳細を明らかにするには、動物実験における、実験動

物の選択，動物飼育室の環境，飼料の純度などの様々な条件検討し，複数の条件にて行うことが必要とされると考えられる．

要約

真核生物の細胞膜構成脂質として普遍的に存在するスフィンゴ脂質はこれまでに経口摂取により様々な機能性を有することが報告されている。これらの報告の中でスフィンゴ脂質の経口摂取が下部消化器の炎症の抑制に効果があることが示唆されたことから、本研究では現在、先進諸国を中心として罹患者数が増大しており、発症の機構および完治方法が不明であるため問題とされている炎症性腸疾患を対象として、その症状緩和・予防効果を期待し、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎発症モデルマウスの大腸炎症における食事性動物由来ならびに植物由来スフィンゴ脂質の効果を検証した。

本研究では、動物由来スフィンゴ脂質として鶏皮より抽出したスフィンゴミエリン (SM) を、植物由来スフィンゴ脂質としてトウモロコシより抽出したグルコシルセラミド (GlcCer) を使用した。大腸炎の誘導は、2%濃度で DSS を添加した飲水を与え、14 日間の飼育により誘導した。

飼料中に 0.1% の割合で SM または GlcCer を添加した試験食を与えた群では、通常試料を与えたコントロール群と比較して、大腸炎症の発症に伴う体重減少が DSS 投与開始 2 日目から 6 日目の期間で有意に抑制されることが確認された。また DSS 投与終了後の大腸粘膜組織において、炎症状態の緩和傾向が認められた。さらに、炎症の初期の働きとして認められる好中球浸潤の指標となる大腸組織中ミエロペルオキシダーゼをウエスタンブロット法により確認したところ、両スフィンゴ脂質投与群において、コントロール群と比較して有意な減少が認められた。また大腸粘膜組織における各種サイトカインの発現をサイトカインアレイにより確認したところ、両スフィンゴ脂質の投与により、炎症性細胞の遊走にかかわるケモカイン類の発現減少が認められた。これらの結果に関して、SM 群と GlcCer 群では差はみとめられなかった。

これらの結果により，食事性のスフィンゴ脂質は，DSS 誘導性の大腸炎を炎症の初期応答を抑えることにより，炎症の誘発を抑制することが示唆された．またこの効果に関しては，動物，植物由来ともに同様の効果を有することが示された．

IV. 総合考察

本研究では、農畜産物未利用物の有効利用につながる新たな機能性の研究を第一の目的とし、その知見を得るため、未利用農畜産物のモデルとして、ナガイモおよびトウモロコシ、鶏皮由来スフィンゴ脂質を研究試料とした。これら各種成分の機能性の研究として、下部消化管疾患に対する効果の検討を行った。

II章ではナガイモの貯蔵タンパク質を用いて、DMH投与系による大腸腺腫発症モデルマウスを用いた、大腸腺腫発症抑制効果を検証した。

本研究ではナガイモ凍結乾燥粉末からのナガイモ塊茎貯蔵タンパク質の抽出を、実際に食品素材として使用することを考慮し、水抽出により行った。タンパク質の回収率は約50%程度であり、同程度のタンパク質が抽出残渣に含まれる計算となる。水抽出は簡便な方法であり、安全性の面からも評価できる方法ではあるが、実際に、機能性素材としてナガイモ塊茎貯蔵タンパク質を利用することを考慮すると、抽出残渣中の残存タンパク質量を減らす、より効率的かつ、安全性に配慮した抽出方法を検討する必要があると考えられる。

ナガイモの大腸腺腫発症抑制作用は木下らが報告している[15; 16]。本研究ではDMH誘導性大腸腺腫発症モデルマウスにおけるナガイモ塊茎貯蔵タンパク質とナガイモ凍結乾燥粉末の効果の比較も行った。この結果、ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質の大腸腺腫発症抑制効果はナガイモ凍結乾燥粉末と比較すると低い結果となった。このことはナガイモの塊茎貯蔵タンパク質がナガイモの大腸腺腫抑制効果の中心的な役割を持つが他の成分も影響し、相乗的な効果によるものであることが推測される。他の成分に関して、著者らはナガイモの不ケン化物のヒト結腸ガン細胞増殖抑制効果を検討し、ナガイモ不ケン化物にがん細胞増殖抑制効果があり、その活性本体は、他の研究者らよりがん細胞増殖抑

制の報告がなされている植物ステロール類[42; 86]であることを報告している[44]. しかしながら, ナガイモ塊茎に含まれる植物ステロールは微量であり, ナガイモの大腸腺腫抑制効果の活性本体にはなりえないと考察した. また大腸ガン抑制に効果があるとされている成分に食物繊維が挙げられるが, これに関しては否定的な報告もなされている[87; 88].

ヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いた増殖抑制試験では, ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質の市販プロテアーゼによる分解物の添加により, Caco-2 細胞の有意な増殖抑制効果が認められた. 一方で未分解物の添加では増殖抑制効果は認められなかった. またナガイモ塊茎貯蔵タンパク質分解物を添加した細胞ではアポトーシスの誘導も確認された. このことからナガイモ塊茎貯蔵タンパク質の大腸腺腫発症抑制効果はナガイモ塊茎貯蔵タンパク質のペプチド断片が活性本体であることが推測される. 実際にナガイモ塊茎貯蔵タンパク質の主要なタンパク質である dioscorin の加水分解物に関する研究では, コンピューター上のシミュレーションでは抗酸化, 抗グリカン活性を有するジペプチドの存在が指摘されている[46; 47]. 本研究では一般に食品に使用されているプロテアーゼを使用した, 体内のタンパク質消化酵素で主として働く物は, トリプシン, キモトリプシンなどである. 酵素の違いによりタンパク質のペプチド断片が異なり, これにより, 効果の違いもあるものだと予測される. この点に関してはさらなる検討が必要とされる.

本研究では, ナガイモおよび塊茎貯蔵タンパク質の大腸腺腫発症抑制効果のメカニズムとして, DMH 誘導性大腸腺腫発症モデルマウスでの結果ならびにヒト結腸がん細胞での結果より, ガン化細胞のアポトーシス誘導の亢進が示唆されたが, このほかに推測されるメカニズムとして, ナガイモ塊茎貯蔵タンパク質のレジスタントプロテイン様の働きをすることにより発がん物質の体外排

出を促進する可能性，ならびに腸内細菌叢への影響が推測される．腸内細菌叢の変遷は大腸ガン発症に大きな影響をあたえることが知られている [4; 89]．大腸菌やウエルシュ菌といった所謂，悪玉菌の増加はデオキシコール酸やリトコール酸といった発がんプロモータとして働く 2 次酸の増加につながる [90]．また，これらの細菌や 2 次胆汁酸自体に細胞障害性もあるため正常細胞のがん細胞化の可能性を高め，結果として大腸がんの発症につながる．ナガイモの腸内細菌叢への影響は山崎らが報告しており，ナガイモの摂取により腸内細菌叢が良好な状態へと変遷する傾向が確認されている．また大腸ガンの発症にかかわる炎症に関しても dioscorin の抗炎症，抗アレルギー反応効果が報告 [48; 49] されていることから，この影響も大きいと考えられる．これらのように様々な影響が複合的に作用し，ナガイモの大腸腺腫発症抑制効果につながるものが推測される．

今回用いた DMH 誘導性大腸腺腫発症モデル系は大腸ガン発症の 80-85% 程度を占める多段階発がん形態に近いモデルであるが，このほかに *de novo* がん発症形態が存在する．この形態は遺伝子修復機構にかかわるミスマッチ修復遺伝子の異常により正常細胞から前がん病変を経ずに直接的に大腸がんが発症する機構であり，大腸がん発症の 15-20% を占めていると考えられている形態である．*de novo* がんの発症のメカニズムは大部分が不明であるが TGF- β 受容体 II などの遺伝子が関与しているとの報告もなされている [91]．この形態に関しては現在モデル動物がほとんどなく，研究が難しい現状にあるが，*de novo* がんの発症抑制に対するナガイモおよび塊茎貯蔵タンパク質の効果の検討も今後期待される．

III 章では哺乳類で主要なスフィンゴ脂質である SM ならびに植物の主要なスフィンゴ脂質である GlcCer が DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの大腸炎症を炎

症の初期において抑制することを示した。またこの効果に関しては動物由来スフィンゴ脂質と植物由来スフィンゴ脂質に大きな違いは認められなかった。

スフィンゴ脂質の機能性を研究するに当たり、経口で摂取したスフィンゴ脂質の消化や吸収といった生体内動態を明らかにする必要があるが、体内動態に関しては未解明な部分が多く存在する。スフィンゴ脂質の分解に関してはこれまでに Schmelz らが糞中のセラミドやスフィンゴイド塩基の存在を確認しており、経口より摂取されたスフィンゴ脂質が体内の消化酵素や腸内細菌の働きにより分解されることを示している。また動物実験において腸内のセラブロシダーゼならびにセラミダーゼ活性の存在を明らかとした[92; 93]。また菅原らはマウスに対するトウモロコシ由来のスフィンゴ脂質投与実験により、腸内容物に植物特有のスフィンゴイド塩基の存在を確認している[94]。以上のことより、経口で摂取されたスフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基まで分解されることが示されている。

スフィンゴ脂質の吸収に関しては、動物由来と植物由来で異なることが示唆されている。Nilson[95; 96]らの報告では、動物由来スフィンゴ脂質の腸管吸収は数%であると示しており、菅原らは腸管カニューレを用いた研究にて、動物由来のスフィンゴ脂質の吸収が 0.8%程度、植物由来のスフィンゴ脂質の吸収が 0.2%程度であることを示している[85]。これらの報告より、動物由来のスフィンゴ脂質が植物由来のスフィンゴ脂質と比較して若干吸収効率は良いことが考えられているが、いずれのスフィンゴ脂質においても、経口により摂取されたスフィンゴ脂質はほとんど吸収されないことが確認される。このことから経口により摂取されたスフィンゴ脂質またはその分解物の大部分が大腸に到達することが予測される。以上のことからスフィンゴ脂質の大腸炎症抑制効果は、直接的に大腸に到達したスフィンゴ脂質もしくはその分解物が炎症部位または

炎症の発症に深くかかわる腸内細菌叢[60; 61; 62]や大腸粘膜層のバリア構造[59; 65; 97]といった、大腸内の環境に影響を与えている結果だと推測される。

スフィンゴ脂質の機能性の一つとして、大腸腺腫発症抑制効果があげられるが、この効果は動物由来ならびに植物由来スフィンゴ脂質の双方で確認されている[24; 67; 68]。炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎の罹患は大腸がんの罹患リスクを増大することが知られているため[98]、本研究の結果を合わせて考慮すると、スフィンゴ脂質は潰瘍性大腸炎の予防および緩和ならびに潰瘍性大腸炎由来の大腸ガン発症抑制にある程度の効果を有することが示唆される。

炎症にかかわるスフィンゴ脂質の働きの一つに炎症シグナル伝達があげられる。生体内に膜脂質として存在するスフィンゴ脂質は炎症反応時における TNF α やインターロイキン 1 β といった炎症性サイトカインなどに刺激を受け、セラミダーゼにより膜から遊離した後、スフィンゴシンキナーゼの働きによりリン酸化を受けスフィンゴシン 1 リン酸に代謝され、細胞膜上に発現している Gタンパク共役受容体に結合することにより細胞遊走などの炎症シグナル伝達にかかわることが報告されている。このように生体内のスフィンゴ脂質が代謝されたスフィンゴシン 1 リン酸は炎症シグナル伝達に関与し炎症の拡大に寄与することが知られているが[99]、一方で今回の結果や他の報告では経口により摂取されたスフィンゴ脂質は、炎症反応を抑制する方向に働くことが示されている。炎症にかかわるスフィンゴ脂質はこのように生体内のものと生体外から摂取されたもので異なる働きをすることになるが、詳細なメカニズムに関して、特に経口摂取により生体内に入ったスフィンゴ脂質がどのような働きをして様々な効果を及ぼすかは明らかになっていないことが多く、今後の研究の進展が期待される。

本研究のテーマとして、未利用農畜産物の有効利用を取り上げ、ナガイモ、

トウモロコシ，廃鶏鳥皮を未利用農産物のモデルとして研究対象としている．未利用農畜産物の利用の利点として，資源の有効活用，農畜産物の付加価値化による農家所得の上昇，新たな需要創設による産業の育成などがあげられる．このため食用品のみでなく非食用品においても未利用物の有効利用に関する研究が盛んに行われている．今回取り上げた植物由来のスフィンゴ脂質はすでに機能性素材として製品に利用されており，錠剤や粉末タイプのサプリメントだけでなくドリンクや菓子などの食品，化粧品等に利用されている．現在は米やトウモロコシ，こんにゃく由来のものが市販されているが，スフィンゴ脂質は真核生物に普遍的に存在するため，様々な未利用農産物が原材料として利用することが可能な機能性成分である．また，動物由来のスフィンゴ脂質に関して，本研究や他の機能性に関する報告でも植物由来のスフィンゴ脂質と同様な効果を持つことが報告されていることから，今回，試料に用いた廃鶏鳥皮などの未利用部位をスフィンゴ脂質の原材料とすることで，精製が困難な植物由来のスフィンゴ脂質の利用が主流となっているために現在では比較的高額なスフィンゴ脂質がより簡便に得ることができることにより，安価で使用する事が可能となる．さらに本研究では試験材料として使用できなかったが，植物にはスフィンゴ脂質として，セラミドに糖とイノシトールリン酸が結合したフィトグリコリピッド（PGL）が GlcCer よりも著量に含まれることが知られている[100; 101]．しかしながら PGL は有機溶媒，水ともに難溶なために現在までに，効率的な抽出方法が不明となっており，完全な単離はなされていない．今後この分野での研究が発展することにより，スフィンゴ脂質素材として PGL の利用が可能となることも考えられる．また，スフィンゴ後脂質の機能性に関してはまだ不明な点が多く存在するため，今後，現在までに不明とされる，消化，吸収の機構や，作用メカニズムの解析，ならびに，生物種により異なるスフィン

ゴシド塩基の構造や、立体配置の違いによる機能性の差異などに関する研究の進展も期待したい。

本研究では、食餌性成分としての機能性を研究したが、それ以外での機能性の研究も期待される。先に述べたようにスフィンゴ脂質はすでに化粧品としての機能性が認められ使用されている。ナガイモに関しても、弘前大学の研究では、主要なナガイモの塊茎貯蔵タンパク質である **dioscorin** が抗インフルエンザ活性を持つことが報告され、タブレットとして口腔や喉のレベルでのインフルエンザ予防素材としての利用も検討されている[102]。このように新たな分野での様々な有用な機能性の研究により、未利用物の利用の可能性が高まることが予測される。これにより、様々な分野での利用が促進し、結果として、食品ロスなどの減少につながり、資源の有効活用に非常に役立つと考えられる。

本研究は未利用物の有効利用に対して、新たな知見を示したと考えられる。しかしながら、これらの研究結果を実用するためには、効果のより詳細な検討、食品への利用や加工の際の物理的特性、性質の研究も必要とされる。そのためより包括的な研究も期待される。

V. 参考文献

- [1]農林水産省 平成21年度 食品ロス統計調査.
- [2]河野邦雄, 伊藤隆造, 坂本裕和, 前島徹, 樋口桂, 『解剖学第2版』. 財団法人 東洋療法学校協会 医歯薬出版 (2006).
- [3]佐藤昭夫, 佐伯由香, 『人体の構造と機能 第2版』 医歯薬出版 (2009).
- [4]光岡知足, 『腸内菌の世界』. 叢文社 (1980).
- [5]野上龍太郎, 島田達生, 潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜形態的特徴ー特に胚細胞についてー, 2007.
- [6]Bruce Ian Bogart, Victoria H. Ort 「インテグレートッドシリーズ 3 解剖学・発生学」 佐藤宏, 大谷修, 小澤一史, 村上徹訳, 東京化学同人, (2011).
- [7]K. Honda, D.R. Littman, The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annual review of immunology* 30 (2012) 759-795.
- [8]がんの統計編集委員会, がんの統計'10. 33 (2010).
- [9]N. Sakamoto, S. Kono, K. Wakai, Y. Fukuda, M. Satomi, T. Shimoyama, Y. Inaba, Y. Miyake, S. Sasaki, K. Okamoto, G. Kobashi, M. Washio, T. Yokoyama, C. Date, H. Tanaka, J. Epidemiology Group of the Research Committee on Inflammatory Bowel Disease in, Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflammatory bowel diseases* 11 (2005) 154-163.
- [10]P. Vernia, A. Marcheggiano, R. Caprilli, G. Frieri, G. Corrao, D. Valpiani, M.C. Di Paolo, P. Paoluzi, A. Torsoli, Short-chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology &*

- therapeutics 9 (1995) 309-313.
- [11]佐藤一郎, 野菜園芸大百科 第2版「サトイモ, ナガイモ, レンコン, ウド, フキ, ミョウガ」. 農文協 (2004) 63-64.
- [12]S.J. Chang, Y.C. Lee, S.Y. Liu, T.W. Chang, Chinese yam (*Dioscorea alata* cv. Tainung No. 2) feeding exhibited antioxidative effects in hyperhomocysteinemia rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 52 (2004) 1720-1725.
- [13]J.R. Jeon, J.S. Lee, C.H. Lee, J.Y. Kim, S.D. Kim, D.H. Nam, Effect of ethanol extract of dried Chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour containing dioscin on gastrointestinal function in rat model. *Archives of pharmacol research* 29 (2006) 348-353.
- [14]M.H. Yang, K.D. Yoon, Y.W. Chin, J.H. Park, S.H. Kim, Y.C. Kim, J. Kim, Neuroprotective effects of *Dioscorea opposita* on scopolamine-induced memory impairment in in vivo behavioral tests and in vitro assays. *Journal of ethnopharmacology* 121 (2009) 130-134.
- [15]木下幹朗, 柚木恵太, 得字圭彦, 川原美香, 大庭潔, 弘中和憲, 大西正男, 大腸腺腫発症モデルマウスにおける食餌性ナガイモおよびナガイモ入り青汁の効果, *日本食品科学工学会誌* 56 (2009), pp. 53-55.
- [16]木下幹朗, 柚木恵太, 得字圭彦, 川原美香, 大庭潔, 弘中和憲, 大西正男, -.ジ. 日.-. 1, 1,2-ジメチルヒドラジン投与マウスにおける大腸腺腫発症に与える食餌性ナガイモの効果. *日本食品科学工学会誌* 55 (2008) 270-275.
- [17]M. Gaidamashvili, Y. Ohizumi, S. Iijima, T. Takayama, T. Ogawa, K. Muramoto, Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities. *The Journal of*

- biological chemistry 279 (2004) 26028-26035.
- [18]W.C. Hou, J.S. Liu, H.J. Chen, T.E. Chen, C.F. Chang, Y.H. Lin, Dioscorin, the major tuber storage protein of yam (*Dioscorea batatas decne*) with carbonic anhydrase and trypsin inhibitor activities. *Journal of agricultural and food chemistry* 47 (1999) 2168-2172.
- [19]T. Nagai, T. Nagashima, Functional properties of dioscorin, a soluble viscous protein from Japanese yam (*Dioscorea opposita thunb.*) tuber mucilage Tororo. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 61 (2006) 792-798.
- [20]P.R. Shewry, Tuber storage proteins. *Annals of botany* 91 (2003) 755-769.
- [21]W.Y. Tsai, Y.J. Jheng, K.H. Chen, K.W. Lin, Y.P. Ho, C.C. Yang, K.C. Lin, Molecular cloning, structural analysis and mass spectrometric identification of native dioscorins of various yam species. *Journal of the science of food and agriculture* 93 (2013) 761-770.
- [22]H. Vesper, E.M. Schmelz, M.N. Nikolova-Karakashian, D.L. Dillehay, D.V. Lynch, A.H. Merrill, Jr., Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *The Journal of nutrition* 129 (1999) 1239-1250.
- [23]西川研次郎監修, 食品機能性の科学編集委員会編集, 食品機能性の科学「第 2 節 スフィンゴ脂質」, 産業技術サービスセンター, 2008.
- [24]K. Aida, M. Kinoshita, M. Tanji, T. Sugawara, M. Tamura, J. Ono, N. Ueno, Ohnishi, , M.Prevention of Aberrant Crypt Foci Formation by Dietary Maize and Yeast Cerebrosides in 1,2-Dimethylhydrazine-treated Mice, in, . *Journal of Oleo Science* 2005, pp. 45-49.

- [25]J. Ono, M. Kinoshita, K. Aida, M. Tamura, M. Ohnishi, Effects of dietary glucosylceramide on dermatitis in atopic dermatitis model mice, in, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010, pp. 708-711.
- [26]A. Fischbeck, K. Leucht, I. Frey-Wagner, S. Bentz, T. Pesch, S. Kellermeier, M. Krebs, M. Fried, G. Rogler, M. Hausmann, H.U. Humpf, Sphingomyelin induces cathepsin D-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells and increases inflammation in DSS colitis. *Gut* 60 (2011) 55-65.
- [27]H. Furuya, S. Ohkawara, K. Nagashima, N. Asanuma, T. Hino, Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice. *International journal for vitamin and nutrition research*. 78 (2008) 41-49.
- [28]農林水産省ホームページ, 作物統計 野菜生産出荷統計 平成 24 年産 「やまのいも, うち, ながいも」, 2012.
- [29]N. Hashimoto, T. Noda, S.J. Kim, M.Z. Sarker, H. Yamauchi, S. Takigawa, C. Matsuura-Endo, T. Suzuki, K.H. Han, M. Fukushima, Yam contributes to improvement of glucose metabolism in rats. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 64 (2009) 193-198.
- [30]Y.W. Liu, J.C. Liu, C.Y. Huang, C.K. Wang, H.F. Shang, W.C. Hou, Effects of oral administration of yam tuber storage protein, dioscorin, to BALB/c mice for 21-days on immune responses. *Journal of agricultural and food chemistry* 57 (2009) 9274-9279.
- [31]Y.W. Liu, H.F. Shang, C.K. Wang, F.L. Hsu, W.C. Hou, Immunomodulatory activity of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv.

- Tainong No. 1) tuber. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 45 (2007) 2312-2318.
- [32]S.L. Fu, Y.H. Hsu, P.Y. Lee, W.C. Hou, L.C. Hung, C.H. Lin, C.M. Chen, Y.J. Huang, Dioscorin isolated from *Dioscorea alata* activates TLR4-signaling pathways and induces cytokine expression in macrophages. Biochemical and biophysical research communications 339 (2006) 137-144.
- [33]F.L. Hsu, Y.H. Lin, M.H. Lee, C.L. Lin, W.C. Hou, Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1), and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. Journal of agricultural and food chemistry 50 (2002) 6109-6113.
- [34]W.C. Hou, M.H. Lee, H.J. Chen, W.L. Liang, C.H. Han, Y.W. Liu, Y.H. Lin, Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. Journal of agricultural and food chemistry 49 (2001) 4956-4960.
- [35]E. McLellan, R.P. Bird, Effect of disulfiram on 1,2-dimethylhydrazine- and azoxymethane-induced aberrant crypt foci. Carcinogenesis 12 (1991) 969-972.
- [36]Y.S. Chiou, M.L. Tsai, Y.J. Wang, A.C. Cheng, W.M. Lai, V. Badmaev, C.T. Ho, M.H. Pan, Pterostilbene inhibits colorectal aberrant crypt foci (ACF) and colon carcinogenesis via suppression of multiple signal transduction pathways in azoxymethane-treated mice. J Agric Food Chem 58 (2010)

8833-8841.

- [37]A. Allameh, A. Dadkhah, F. Rahbarizadeh, J. Ashrafi-Helan, F. Fatemi, Effect of dietary caraway essential oils on expression of β -catenin during 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *J Nat Med* 67 (2013) 690-697.
- [38]M.F. Fragoso, G.R. Romualdo, D.A. Ribeiro, L.F. Barbisan, Açai (Euterpe oleracea Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 58 (2013) 68-76.
- [39]A.F. Gomides, S.O. de Paula, D.D. Rosa, L.L. de Oliveira, D.S. Comastri, M.o.C. Peluzio, Use of defatted flaxseed meal reduces precancerous colon lesions in C57BL/6 mice. *Acta Cir Bras* 28 (2013) 607-613.
- [40]Y. Takano, T. Matsuura, Y. Yoshikawa, H. Satsu, R. Sato, M. Shimizu, Modulation of the intestinal Ca^{2+} uptake by a cheese whey protein digest. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71 (2007) 1487-1493.
- [41]U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [42]T. Nakazawa, N. Xui, Z. Hesong, M. Kinoshita, T. Chiba, E. Kaneko, K. Yui, K. Shimokado, Danshen inhibits oxysterol-induced endothelial cell apoptosis in vivo. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 12 (2005) 132-137.
- [43]P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey, Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition

- ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition* 123 (1993) 1939-1951.
- [44]山崎民子, 荒井克仁, 松下容子, 得字圭彦, 川原美香, 大庭潔, 木下幹朗, 大西正男, 北海道産ナガイモ凍結乾燥物の脂質組成およびヒト結腸がん細胞増殖抑制作用, *日本食品科学工学会誌*, 58, (2011), pp. 567-575.
- [45]R. Shiraishi, T. Fujise, T. Kuroki, T. Kakimoto, L. Miao, Y. Sakata, S. Tsunada, T. Noda, R. Iwakiri, K. Fujimoto, Long-term ingestion of reduced glutathione suppressed an accelerating effect of beef tallow diet on colon carcinogenesis in rats. *J Gastroenterol* 44 (2009) 1026-1035.
- [46]C.H. Han, Y.S. Lin, S.Y. Lin, W.C. Hou, Antioxidant and antiglycation activities of the synthesised dipeptide, Asn-Trp, derived from computer-aided simulation of yam dioscorin hydrolysis and its analogue, Gln-Trp. *Food chemistry* 147 (2014) 195-202.
- [47]C.H. Han, J.C. Liu, S.U. Fang, W.C. Hou, Antioxidant activities of the synthesized thiol-contained peptides derived from computer-aided pepsin hydrolysis of yam tuber storage protein, dioscorin. *Food chemistry* 138 (2013) 923-930.
- [48]J.Y. Hsu, J.J. Chu, M.C. Chou, Y.W. Chen, Dioscorin pre-treatment protects A549 human airway epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Inflammation* 36 (2013) 1013-1019.
- [49]Y.J. Jheng, W.Y. Tsai, K.H. Chen, K.W. Lin, C.L. Chyan, C.C. Yang, K.C. Lin, Recombinant dioscorins of the yam storage protein expressed in *Escherichia coli* exhibit antioxidant and immunomodulatory activities. *Protein expression and purification* 85 (2012) 77-85.

- [50]G. Steinbach, P.M. Lynch, R.K. Phillips, M.H. Wallace, E. Hawk, G.B. Gordon, N. Wakabayashi, B. Saunders, Y. Shen, T. Fujimura, L.K. Su, B. Levin, L. Godio, S. Patterson, M.A. Rodriguez-Bigas, S.L. Jester, K.L. King, M. Schumacher, J. Abbruzzese, R.N. DuBois, W.N. Hittelman, S. Zimmerman, J.W. Sherman, G. Kelloff, The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *The New England journal of medicine* 342 (2000) 1946-1952.
- [51]M.E. Martinez, E.L. Giovannucci, G.A. Colditz, M.J. Stampfer, D.J. Hunter, F.E. Speizer, A. Wing, W.C. Willett, Calcium, vitamin D, and the occurrence of colorectal cancer among women. *Journal of the National Cancer Institute* 88 (1996) 1375-1382.
- [52]M.H. Yang, K.D. Yoon, Y.W. Chin, J.H. Park, J. Kim, Phenolic compounds with radical scavenging and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitory activities from *Dioscorea opposita*. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17 (2009) 2689-2694.
- [53]N. Azuma, K. Machida, T. Saeki, R. Kanamoto, K. Iwami, Preventive effect of soybean resistant proteins against experimental tumorigenesis in rat colon. *Journal of nutritional science and vitaminology* 46 (2000) 23-29.
- [54]C. Lepage, D.Y. Leger, J. Bertrand, F. Martin, J.L. Beneytout, B. Liagre, Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer letters* 301 (2011) 193-202.
- [55]N. Miyoshi, T. Nagasawa, R. Mabuchi, Y. Yasui, K. Wakabayashi, T. Tanaka, H. Ohshima, Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium

- sulfate-induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam sanyaku and its constituent diosgenin. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 4 (2011) 924-934.
- [56] I.S. Son, J.H. Kim, H.Y. Sohn, K.H. Son, J.S. Kim, C.S. Kwon, Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71 (2007) 3063-3071.
- [57] 難病情報センターホームページ 潰瘍性大腸炎（公費対象）
<http://www.nanbyou.or.jp/entry/62>
- [58] 難病情報センターホームページ クロウン病（公費対象）
<http://www.nanbyou.or.jp/entry/81>
- [59] N. Takakuwa, K. Saito, M. Ohnishi, Y. Oda, Determination of glucosylceramide contents in crop tissues and by-products from their processing. *Bioresource technology* 96 (2005) 1089-1092.
- [60] R.B. Sartor, Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134 (2008) 577-594.
- [61] R.B. Sartor, M. Muehlbauer, Microbial host interactions in IBD: implications for pathogenesis and therapy. *Current gastroenterology reports* 9 (2007) 497-507.
- [62] H. Tlaskalova-Hogenova, L. Tuckova, R. Stepankova, T. Hudcovic, L. Palova-Jelinkova, H. Kozakova, P. Rossmann, D. Sanchez, J. Cinova, T. Hrcir, M. Kverka, L. Frolova, H. Uhlig, F. Powrie, P. Bland, Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*

1051 (2005) 787-798.

- [63]D. Camuesco, J. Galvez, A. Nieto, M. Comalada, M.E. Rodriguez-Cabezas, A. Concha, J. Xaus, A. Zarzuelo, Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. *The Journal of nutrition* 135 (2005) 687-694.
- [64]S. Melgar, L. Karlsson, E. Rehnstrom, A. Karlsson, H. Utkovic, L. Jansson, E. Michaelsson, Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol* 8 (2008) 836-844.
- [65]R. Mennigen, K. Nolte, E. Rijcken, M. Utech, B. Loeffler, N. Senninger, M. Bruewer, Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296 (2009) G1140-1149.
- [66]I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, R. Nakaya, A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98 (1990) 694-702.
- [67]T. Vowinkel, T.J. Kalogeris, M. Mori, C.F. Krieglstein, D.N. Granger, Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Digestive diseases and sciences* 49 (2004) 556-564.
- [68]Y. Yan, V. Kolachala, G. Dalmasso, H. Nguyen, H. Laroui, S.V. Sitaraman, D. Merlin, Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PloS one* 4 (2009)

e6073.

- [69]K. Yunoki, T. Ogawa, J. Ono, R. Miyashita, K. Aida, Y. Oda, M. Ohnishi, Analysis of sphingolipid classes and their contents in meals. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72 (2008) 222-225.
- [70]J. Duan, T. Sugawara, T. Hirata, Rapid quantitative analysis of sphingolipids in seafood using HPLC with evaporative light-scattering detection: its application in tissue distribution of sphingolipids in fish. *J Oleo Sci* 59 (2010) 509-513.
- [71]L. Hellgren, Occurrence of bioactive sphingolipids in meat and fish products. , in, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2001, pp. 661-667.
- [72]N. Bartke, A. Fischbeck, H.U. Humpf, Analysis of sphingolipids in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by reversed phase high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). *Molecular nutrition & food research* 50 (2006) 1201-1211.
- [73]H. Imai, M. Oinishi, K. Hothubo, M. Kojima, S. Ito, Sphingoid base composition of cerebrosides from plant leaves, in, *Biosci Biotechnol Biochem* 1997, pp. 351-353.
- [74]D. Lynch, V., M. Dunn, T., An introduction to plant sphingolipids and review of recent advances in understanding their metabolism and function. , in, *New Phytologist* 2004, pp. 677-702.
- [75]Y. Mizutani, S. Mitsutake, K. Tsuji, A. Kihara, Y. Igarashi, Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* 91

(2009) 784-790.

- [76]M. Ohnishi, Y. Fijino, Chemical composition of ceramide and cerebroside in Azuki bean seeds, in, *Agric Biol Chem*, 1981, pp. 1283-1284.
- [77]T. Sugawara, K. Aida, J. Duan, T. Hirata, Analysis of glucosylceramides from various sources by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Oleo Sci* 59 (2010) 387-394.
- [78]M. Ohnishi, Y. Fijino, Sphingolipids in immature and mature soybeans, in, *Lipids* 1982, pp. 803-810.
- [79]S.T. Pruett, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C.A. Haynes, M.C. Sullards, D.C. Liotta, A.H. Merrill, Jr., Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *Journal of lipid research* 49 (2008) 1621-1639.
- [80]J. Duan, T. Sugawara, S. Sakai, K. Aida, T. Hirata, Oral glucosylceramide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene induced inflammatory response in mice by reducing TNF-alpha levels and leukocyte infiltration. *Lipids* 46 (2011) 505-512.
- [81]W. Gehring, J. Wenz, M. Gloor, Influence of topically applied ceramide/phospholipid mixture on the barrier function of intact skin, atopic skin and experimentally induced barrier damage. *International journal of cosmetic science* 19 (1997) 143-156.
- [82]E. Shimada, K. Aida, T. Sugawara, T. Hirata, Inhibitory effect of topical maize glucosylceramide on skin photoaging in UVA-irradiated hairless mice. *J Oleo Sci* 60 (2011) 321-325.
- [83]K. Yunoki, M. Renaguli, M. Kinoshita, H. Matsuyama, S. Mawatari, T.

- Fujino, Y. Kodama, M. Sugiyama, M. Ohnishi, Dietary sphingolipids ameliorate disorders of lipid metabolism in Zucker fatty rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 58 (2010) 7030-7035.
- [84]J.C. Mazzei, H. Zhou, B.P. Brayfield, R. Hontecillas, J. Bassaganya-Riera, E.M. Schmelz, Suppression of intestinal inflammation and inflammation-driven colon cancer in mice by dietary sphingomyelin: importance of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *The Journal of nutritional biochemistry* 22 (2011) 1160-1171.
- [85]T. Sugawara, T. Tsuduki, S. Yano, M. Hirose, J. Duan, K. Aida, I. Ikeda, T. Hirata, Intestinal absorption of dietary maize glucosylceramide in lymphatic duct cannulated rats. *Journal of lipid research* 51 (2010) 1761-1769.
- [86]T.A. Woyengo, V.R. Ramprasath, P.J. Jones, Anticancer effects of phytosterols. *European journal of clinical nutrition* 63 (2009) 813-820.
- [87]I.L. Cameron, W.E. Hardman, D.W. Heitman, The nonfermentable dietary fiber lignin alters putative colon cancer risk factors but does not protect against DMH-induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 28 (1997) 170-176.
- [88]G.S. Ranhotra, J.A. Gelroth, B.K. Glaser, P. Schoening, S.E. Brown, Cellulose and calcium lower the incidence of chemically-induced colon tumors in rats. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 54 (1999) 295-303.
- [89]内田清久, 市橋輝久, 胆汁酸の代謝と毒性—大腸癌のプロモーター—, in, トキシコロジーフォーラム, 1989, pp. 601-609.

- [90]内田清久, 胆汁酸代謝と腸内細菌 ビフィズス, 5 (1992) pp. 157-172.
- [91]S. Olschwang, R. Hamelin, P. Laurent-Puig, B. Thuille, Y. De Rycke, Y.J. Li, F. Muzeau, J. Girodet, R.J. Salmon, G. Thomas, Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997) 12122-12127.
- [92]E.M. Schmelz, M.C. Sullards, D.L. Dillehay, A.H. Merrill, Jr., Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1, 2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. The Journal of nutrition 130 (2000) 522-527.
- [93]E.M. Schmelz, P.C. Roberts, E.M. Kustin, L.A. Lemonnier, M.C. Sullards, D.L. Dillehay, A.H. Merrill, Jr., Modulation of intracellular beta-catenin localization and intestinal tumorigenesis in vivo and in vitro by sphingolipids. Cancer research 61 (2001) 6723-6729.
- [94]T. Sugawara, M. Kinoshita, M. Ohnishi, J. Nagata, M. Saito, Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells. The Journal of nutrition 133 (2003) 2777-2782.
- [95]A. Nilsson, Metabolism of cerebroside in the intestinal tract of the rat. Biochimica et biophysica acta 187 (1969) 113-121.
- [96]A. Nilsson, Metabolism of sphingomyelin in the intestinal tract of the rat. Biochimica et biophysica acta 164 (1968) 575-584.
- [97]L.S. Poritz, K.I. Garver, C. Green, L. Fitzpatrick, F. Ruggiero, W.A. Koltun, Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. The Journal of surgical research 140 (2007) 12-19.
- [98]M. Kanneganti, M. Mino-Kenudson, E. Mizoguchi, Animal models of

- colitis-associated carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011 (2011) 342637.
- [99]R.D. Duan, A. Nilsson, Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. *Progress in lipid research* 48 (2009) 62-72.
- [100]A. Bjorkbom, H. Ohvo-Rekila, P. Kankaanpaa, T.K. Nyholm, B. Westerlund, J.P. Slotte, Characterization of membrane properties of inositol phosphorylceramide. *Biochimica et biophysica acta* 1798 (2010) 453-460.
- [101]M.S. Cardoso, C. Junqueira, R.C. Trigueiro, H. Shams-Eldin, C.S. Macedo, P.R. Araujo, D.A. Gomes, P.M. Martinelli, J. Kimmel, P. Stahl, S. Niehus, R.T. Schwarz, J.O. Previato, L. Mendonca-Previato, R.T. Gazzinelli, S.M. Teixeira, Identification and functional analysis of *Trypanosoma cruzi* genes that encode proteins of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway. *PLoS neglected tropical diseases* 7 (2013) e2369.
- [102]工藤重光, 加藤陽治, 伊藤聖子, 畑山一郎, 三上稔之, 市田淳治, 奈良岡馨, 大学発!おいしいバイオ ナガイモでインフルエンザ予防 生物工学, 2009, pp. 256-257.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を頂きました帯広畜産大学畜産学部食品科学研究部門准教授・木下幹朗先生をはじめ、藤女子大学人間生活学部食物栄養学科教授・大西正男先生、帯広畜産大学畜産学部食品科学部門准教授・得字圭彦先生、および弘前大学農学生命科学部助教の前多隼人先生に心より御礼申し上げます。

また、本論文の審査を引き受けてくださいました、岩手大学農学部応用生物化学課程准教授の伊藤芳明先生に謹んで感謝の意を表す次第であります。

最後に研究の遂行にあたりご協力いただいた帯広畜産大学食品・生物資源科学専攻の大学院生、学部生の皆様に深く感謝いたします。