

学位論文

難消化性オリゴ糖の包括的定量法の改良に関する研究

**Study on improvement of a comprehensive determination method
for nondigestible oligosaccharides**

2014年3月

長崎県立大学大学院
人間健康科学研究科 栄養科学専攻
紹介教員：大曲 勝久

田辺 賢一

I. 序	1
II. 実験材料ならびに方法	8
1. AOAC 2001.03 法によるオリゴ糖定量の問題点と解決策の検討	8
1) AOAC 2001.03 法によるオリゴ糖定量の問題点の検証	8
(1) 試験物質	8
(2) 試薬	8
(3) AOAC 2001.03 法によるオリゴ糖定量の手順	8
2) 給源の異なる低分子糖質水解酵素を用いたオリゴ糖の水解能の比較・検討	9
(1) ブタならびにヒトの小腸粘膜二糖類水解酵素活性の比較	9
①試験物質	9
②ブタ小腸粘膜ホモジネートの調製	9
③ヒト小腸粘膜ホモジネートの調製	10
④二糖類水解酵素活性の測定	10
⑤タンパク質濃度の測定	10
(2) ブタならびにヒトの小腸粘膜酵素で処理したオリゴ糖水解物の分離・同定	10
(3) <i>Aspergillus niger</i> 由来の α -グルコシダーゼで処理したオリゴ糖水解物の分離・同定	11
(4) <i>Bacillus circulans</i> 由来の β -ガラクトシダーゼで処理したオリゴ糖水解物の分離・同定	11
3) AOAC 2001.03 法の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した難消化性オリゴ糖定量法の妥当性の検討	11
(1) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の調製	11
(2) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液のタンパク質濃度の測定	11
(3) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の α -グルコシダーゼ unit 量の測定	11
(4) AOAC 2001.03 法の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した難消化性オリゴ糖定量法の手順	11
2. AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点とその要因の検証	12
1) AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点の検証	12
(1) 試験物質	12
(2) 試薬	12
(3) AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の手順	12
2) AOAC 2009.01 法に用いられているアミログルコシダーゼによるオリゴ糖水解能の検証	13
(1) アミログルコシダーゼならびにヒト小腸粘膜酵素によるオリゴ糖水解能の比較	13

①試験物質 -----	13
②ヒト小腸粘膜ホモジネートの調製 -----	13
③タンパク質濃度の測定 -----	13
④ α -グルコシダーゼ unit 量の測定 -----	13
⑤オリゴ糖の水解実験の手順 -----	13
(2) アミログルコシダーゼの添加量とオリゴ糖水解能の検討 -----	13
①試験物質 -----	13
②ブタ膵 α -アミラーゼおよびアミログルコシダーゼの酵素混合溶液の調製 --	14
③アミログルコシダーゼを用いた AOAC 2009.01 法において生成されるオリ ゴ糖水解物の同定 -----	14
3. AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変 法の提案と検証 -----	14
1) AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良 変法における酵素添加量の検討 -----	14
(1) 試験物質 -----	14
(2) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の調製 -----	14
(3) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液のタンパク質濃度の測定 -----	14
(4) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の α -グルコシダーゼ unit 量の測定 -----	14
(5) ブタ膵 α -アミラーゼならびにブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の混合酵素溶液 の調製 -----	14
(6) ブタ膵 α -アミラーゼならびにブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の混合酵素溶液 で処理したオリゴ糖水解物の分離・同定 -----	15
2) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖定量の妥当性の検証 -----	15
(1) 試験物質 -----	15
(2) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法によるオリゴ糖定量の手順 -----	16
4. 研究倫理委員会等の審査 -----	17
III. 実験結果 -----	18
1. AOAC 2001.03 法による難消化性オリゴ糖定量の問題点とその解決策の検証 -----	18
1) AOAC 2001.03 法による難消化性オリゴ糖の定量 -----	18
2) 給源の異なる低分子糖質水解酵素を用いたオリゴ糖水解能の比較・検討 -----	18
(1) ブタならびにヒトの小腸粘膜二糖類水解酵素活性の比較 -----	18
(2) ブタならびにヒトの小腸粘膜酵素処理で生成したオリゴ糖水解物 -----	18
(3) <i>Aspergillus niger</i> 由来の α -グルコシダーゼ処理で生成したオリゴ糖水解物 --	19
(4) <i>Bacillus circulans</i> 由来の β -ガラクトシダーゼ処理で生成したオリゴ糖水 解物 -----	19
3) AOAC 2001.03 法の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した難消化性オ	

オリゴ糖の定量 -----	19
2. AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点とその要因の検証 -----	19
1) AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点の検証 -----	19
2) AOAC 2009.01 法に用いられているアミログルコシダーゼによるオリゴ糖水解能の欠陥の検証 -----	20
(1) アミログルコシダーゼならびにヒト小腸粘膜酵素によるオリゴ糖水解能の比較 -----	20
(2) アミログルコシダーゼの添加量とオリゴ糖水解能の検討 -----	21
3. AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変法の提案と検証 -----	21
1) AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変法における酵素添加量の検討 -----	21
2) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖定量の妥当性の検証 --	22
(1) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖の定量 -----	22
(2) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖の定量結果の再現性--	22
(3) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖含有モデル食品のオリゴ糖の定量 -----	23
(4) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いた特定保健用食品ならびに健康食品のオリゴ糖の定量 -----	23
IV. 考察 -----	25
V. 総括 -----	35
VI. 要約 -----	36
VII. 謝辞 -----	37
VIII. 文献 -----	38

本文 50 枚 (表紙・目次を含む)
 図 20 枚 (Fig. 1－Fig. 20)
 表 13 枚 (Table 1－Table 13)

略語表記一覧

AACC: American Association of Cereal Chemists

AMG: Amyloglucosidase (アミログルコシダーゼ)

AOAC: Association of Official Analytical Chemists (米国分析学会)

CCNFSDU: Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses

DP: Degree of polymerization (重合度)

EU: European Union (欧州連合)

FDA: Food and Drug Administration(アメリカ食品医薬品局)

FOS: Fructooligosaccharide (フラクトオリゴ糖)

GF₂: 1-kestose (1-ケストース)

GOS: Galactooligosaccharide (ガラクトオリゴ糖)

GS: Galactosylsucrose (ガラクトシルスクロース)

IMO: Isomaltooligosaccharide (イソマルトオリゴ糖)

IUB-IUPAC: International Union of Biochemistry and Molecular Biology- International Union of Pure and Applied Chemistry

N.D.: Not detected (検出限界以下)

NDO: Nondigestible oligosaccharide (難消化性オリゴ糖)

RMD: Resistant maltodextrin (難消化性デキストリン)

RS: Resistant starch (難消化性デンプン)

RSD: Relative standard deviation (相対標準偏差)

S.A.: Specific activity (比活性)

SD: Standard deviation (標準偏差)

WHO/FAO: World Health Organization/ Food and Agriculture Organization

I. 序

難消化性糖質は、ヒトの消化管において消化・吸収されない、あるいはきわめて消化・吸収されにくい糖質を意味しており、食物繊維をはじめ難消化性オリゴ糖や糖アルコールなどを包括している。未消化物として大腸に到達した難消化性糖質は、そこに棲息する腸内細菌によって発酵を受けて短鎖脂肪酸、炭酸ガス、水素ガス、メタンガスなどに代謝され、一部は菌体成分として利用される¹⁾。この発酵過程で腸内フローラが改善されて消化管腔内環境が良好な状態になり、健康の保持・増進や疾病の予防・回復に寄与する。また、これらの生成物のうち短鎖脂肪酸は宿主のエネルギー源として利用されるが、同時にそれ自身が特有の機能を発現する。様々な生理機能を持った難消化性糖質、特に食物繊維や難消化性オリゴ糖などは健康志向食品に積極的に使用されている。それゆえ、食品中の難消化性糖質含量を明らかにすることは、消費者が期待する生理機能を保証するうえで重要である。本学位論文では、難消化性糖質の中でも難消化性オリゴ糖に焦点をあて、その簡便かつ正確な定量法の確立を試みた。

難消化性糖質のうち食物繊維は古くから健康や疾病との関わりが研究されてきたために、その定量法については多くの研究者によって検討され、議論されてきた。しかしながら、難消化性オリゴ糖の代謝や生理機能に関する研究は歴史が浅いために、現在においてもその定義は流動的な状態にあり、定量法に至っては十分に議論されていない。特に、難消化性オリゴ糖の代謝や機能性に関する先駆的な研究はわが国がリーダー的な立場にあり、海外におけるこの分野の研究はオリゴフラクトース（イヌリン部分分解物）が食品素材として開発されてからである^{2,3)}。このような要因が重なって難消化性オリゴ糖や糖アルコールの定量法に関する議論が不十分な状態に置かれているといえる。

「食物繊維」は、1953年に Hipsley により初めて用語として用いられ、食品の植物細胞壁成分を意味するものと提唱された⁴⁾。また、食物繊維の生理的意義は、1971年に Burkitt が英国およびアフリカにおける住民の食物繊維摂取量と疾病発症に関する比較・観察研究に基づいて、排便促進等の消化管機能を改善するために食物繊維摂取を推奨したことに始まる⁵⁾。その後、Trowell が食物繊維の定義を「ヒトの消化酵素で消化されない植物細胞壁の残渣」とし、1972年に初めて生理的意義を包括した定義を発表した^{6,7)}。

食物繊維の第一義的な生理特性には消化抵抗性がある。したがって、食物繊維の生理的効果の発現は、主に消化管腔内であり、消化管との物理化学的相互作用を介した消化管機能の調節や消化管腔内の内部環境(pH、腸内細菌叢の改善)の調節、ならびに他の食物成分との相互作用(ミネラル吸収促進作用)に影響を与えることである⁸⁾。食物繊維の物理化学的相互作用を介した消化管の機能は主に、便秘改善効果、血清コレステロール上昇抑制効果ならびに食後血糖上昇抑制効果などが挙げられる⁹⁾。生理機能が確認されている食物繊維は、①保水性¹⁰⁾、②吸着性¹⁰⁾、③嵩形成能¹¹⁾、④粘性¹²⁾、ならびに⑤発酵性¹³⁾のいずれかの物理化学的特性を有していることが多い。食物繊維の最も顕著な生理機能の一つとして便秘改善効果がある。食物繊維は、難消化性成分であることから、糞便量を増大させ、消化管通過時間を短縮する¹⁴⁾。しかし、食物繊維には種々の難消化性成分があり、その生理機能は一様ではなく、生理機能の発現は個々の食物繊維が有する物理化学的な特性に大き

く左右される。不溶性食物繊維のセルロースなど腸内細菌による発酵を受けにくいものは、糞便量増加効果が著しい¹⁴⁾。これに対して水溶性食物繊維であるペクチンなどは、腸内細菌によって資化されるため、糞便量増加効果は不溶性食物繊維に比べて期待できない¹⁴⁾。しかし、この場合、発酵によって生じる短鎖脂肪酸が大腸を刺激して排便を促進する機能を有することが期待される¹³⁾。これらの結果は、水溶性食物繊維と不溶性食物繊維で生理学的特性が異なることを示している。

食物繊維の定義が1972年に初めて生理的意義を付して発表以降、食物繊維は2つの異なった原理に基付いた方法で定量されることとなった。一つはTrowellの食物繊維の定義に則った「植物細胞壁の残渣」すなわち、「加水分解されない植物の非デンプン性多糖類」を測定する定量法の確立である。「植物の非デンプン性多糖類」を食物繊維として定量する分析方法は、時代の変遷とともに変化し¹⁵⁻¹⁹⁾、この考え方はEnglyst法に受け継がれ、英国の食物繊維定量法（非デンプン性多糖類定量法）として採用された²⁰⁾。

これらの方法に対して、食物繊維の定義である「ヒトの消化酵素で消化されない」ことに着目した定量法がHellendornによって提案された²¹⁾。この定量法は酵素一重量法と呼称され、水解酵素を用いて試料中の消化性成分を水解して低分子化し、水解されない高分子残渣の重量を秤量して食物繊維量とする方法である。その後、Aspをはじめとした多くの研究者により酵素一重量法は改良され²²⁻²⁶⁾、1985年米国分析学会はProskyらによって開発された方法を食物繊維のAssociation of Official Analytical Chemists (AOAC) INTERNATIONALの公定法として採用した²⁷⁾。1987年、アメリカ食品医薬品局(FDA)は食物繊維の定義を「酵素一重量法(Prosky法)で定量できる成分」、あるいはこれに該当する「ヒトの消化酵素では消化できない植物性食品の成分」とした²⁸⁾。

1988年までの食物繊維の定義ならびにその変遷をTable 1にまとめたが、国際的な合意は得られていない^{6,9,20,27-36)}。食物繊維の生体に及ぼす各種機能を解明する研究が1980年代から1990年代にかけて進展し、食物繊維の定義は物理化学的特性に留まらず、腸内細菌を介した間接的な生理的特性についても考慮する必要性が認識されはじめた。2001年アメリカ穀物学会(AACC)は、これまでの研究成果や動向を考慮した新たな定義を提案した(Table 1)。この新しい定義の提案は難消化性オリゴ糖などを含めた食物繊維の多様性を考慮し、物理化学的特性のみでなく、難消化性オリゴ糖などの低分子成分の機能性についても考慮された⁹⁾。2003年に日本食物繊維学会は食物繊維を包括した新しい概念として「ルミナコイド(Luminacoid)」という用語を提唱している。「ルミナコイド」の概念は、「ヒトの小腸内で消化・吸収されにくく、消化管を介して健康の維持に役立つ生理作用を発現する食物成分」と定義されている(Table 1)³⁶⁾。Luminacoidの語源は、luminal(消化管腔内のという意味)と、accord(調和)と、-coid(—のようなもの、—質の)の3つの単語を合成した造語である³⁶⁾。ルミナコイドの分類についてはFig. 1に示す。近年、従来の難消化性オリゴ糖ならびに糖アルコールとは異なった生体利用性および種々の機能性を示す低分子の希少糖などの新しいタイプの糖質が開発されている。食物繊維の定義を巡る国際間の意見の相違は、食物繊維に加え、難消化性オリゴ糖、糖アルコールならびに希少糖の存在によって混乱を招く可能性が予想される。今後、これらの糖質を包括した新たな定義を提案することが必須になると考えられる。

様々な生理機能を有した難消化性オリゴ糖は、ショ糖やデンプンなどの消化性糖質とは異なる経路で代謝される^{1,37,38)}。経口摂取した難消化性オリゴ糖は消化を免れて大腸に到達し、腸内細菌に

よる発酵を受けて短鎖脂肪酸のほか、炭酸ガス、水素ガス、メタンガスならびにアミノ酸に代謝され、また一部は菌体成分となる^{1,37,38)}。このうち水素ガスは身体細胞の酸化過程では生成されないため、呼気水素ガス排出量は難消化性糖質が腸内細菌によって資化された指標として用いられている^{1,39)}。

一方、難消化性糖質が腸内細菌によって発酵され産生された短鎖脂肪酸は、大腸管腔内の pH を 6.5-7.0 付近に低下させることにより耐酸性の *Bifidobacterium* ならびに *Lactobacillus* などのいわゆる有用菌を増殖させ、酸性環境に弱い腐敗菌や大腸菌などのいわゆる有害菌の増殖を抑制する^{1,39)}。有用菌の占有率が高い大腸管腔内環境においては、病原微生物の増殖が抑制されるため、それらに感染しても発症が阻止されると考えられている³⁹⁾。この他、難消化性オリゴ糖は、①エネルギー摂取低減効果^{1,40)}、②インスリン節約作用^{1,40)}、③う蝕軽減効果^{1,40,41)}、④腸内環境改善効果^{1,38,39,42-44)}、⑤大腸からのミネラル吸収促進作用^{38,45,46)}、⑥小腸粘膜成長促進作用⁴³⁾などの生理作用を有していることが明らかにされている。

近年、腸内フローラが宿主の健康の保持・増進や疾病の予防・回復と深くかかわっていることが次第に解明されてきた^{47,48)}。宿主の腸内フローラ改善に影響を与える要因としてプロバイオティクス (probiotics) とプレバイオティクス (prebiotics) がある。難消化性オリゴ糖などのプレバイオティクスは、1995 年に Gibson らによって提唱された用語で、有用な腸内細菌を介した生体調節機能に着目している。プレバイオティクスの摂取は大腸内の特定細菌の増殖および活性を選択的に変化させ、腸内フローラを改善させて消化管腔内環境を良好な状態にし、健康の保持・増進や疾病の予防・回復などに寄与する物質とされている⁴²⁻⁴⁴⁾。

食物繊維の一部はプレバイオティクスとしての要件を満たすとされ、特定保健用食品の関与する成分として認可されている。また、難消化性オリゴ糖として扱われているフラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖、乳果オリゴ糖、キシロオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラフィノース、ラクチュロース、コーヒー豆マンノオリゴ糖なども特定保健用食品の関与成分として認可されている⁴⁹⁾。この中でも規格基準型の関与成分として食物繊維は 3 種類、難消化性オリゴ糖は 6 種類が認可されている⁵⁰⁾。

食物繊維や難消化性オリゴ糖などの生理的特性が明らかになるに伴い Trowell の食物繊維の定義が拡大されることとなった。食物繊維とは単一の物質ではなく、様々な物質の集合体の総称である。このため、食物繊維の定量分析とその定義は非常に密接な関係にあり、定義が変われば分析法もそれに合わせて変化する⁵¹⁾。それゆえ、従来の食物繊維定量法である Prosky 法ならびに水溶性および不溶性食物繊維を分別して定量する AOAC 991.43 法 (Prosky 変法)⁵²⁾では、高分子画分の食物繊維しか定量できないため、低分子成分を包括した食物繊維の定量法になりえない。Prosky 法は、水分解酵素により消化性糖質およびタンパク質を完全に水解させ、エタノール沈殿した高分子画分の重量を測定する方法である^{26,27)}。そのため、エタノール沈殿する高分子画分は Prosky 法で定量できるが、すでに加工食品へ使用されているポリデキストロース、難消化性デキストリン (RMD) ならびにインスリン部分分解物などの低分子水溶性食物繊維 (重合度 (DP) が 10 程度の難消化性糖質) や、DP がさらに低い難消化性オリゴ糖については、Prosky 法では定量することができないことが問題視された⁵¹⁾。

現在、難消化性オリゴ糖を含む食物繊維の包括的な定義に則った定量法の確立は、国際的な取り組みとして大きく二つに分かれている。一つは、Englyst 法²⁰⁾ならびに Quigley 法⁵³⁾などの Englyst の研究グループによる食品中の食物繊維素材に重点を置いた定量法である。もう一つは、ヒト消化酵素で消化されない糖質を食物繊維として定量することに重点を置いたもので、AOAC を中心にした Prosky 法を一部改変した AOAC 2001.03 法である⁵⁴⁾。この方法は、低分子水溶性食物繊維である RMD の個別定量法としても認可されている (Fig. 2)。AOAC 2001.03 法は食物繊維定量法と同じ糖質水解酵素である細菌性の耐熱性 α -アミラーゼおよびアミログルコシダーゼ (AMG) を用いて消化性成分を水解後、エタノール沈殿した高分子画分の食物繊維重量を測定する (酵素-重量法) と共に、エタノール沈殿しなかった上清に含まれる低分子画分のオリゴ糖などを HPLC で分析・定量する (酵素-HPLC 法)。したがって、酵素-重量法ならびに酵素-HPLC 法によって得られた結果を合算したものが総食物繊維量として取り扱われている。それゆえ、AOAC 2001.03 法は、Prosky 法の測定原理を踏襲していることから食物繊維 (酵素-重量法) と難消化性オリゴ糖 (酵素-HPLC 法) の統合定量法とされている。AOAC 2001.03 法は、Englyst らの研究グループが推奨する定量法と比較し、食品中の食物繊維素材を特定することはできないが、比較的簡便・迅速に定量することが可能な利点がある。また、これまで Prosky 法が食物繊維定量法として普及していたことから、新たな設備投資が少なく済む利点も併せ持っている。さらに、施設間における定量法の大規模な妥当性検討がすでに実施されているという背景もある。それゆえ、わが国においても、AOAC 2001.03 法が栄養表示基準制度に関わる食物繊維ならびに難消化性オリゴ糖定量の公定法として採用されている⁵⁴⁾。

申請者は、難消化性オリゴ糖の代謝や機能性を研究する過程で、従来の AOAC 2001.03 法では難消化性オリゴ糖を正確に定量できないのではないかと考えた。難消化性オリゴ糖定量法に取り組むこととなった理由は以下のことと関係している。イソマルトオリゴ糖 (IMO) の摂取によって腸内細菌叢を改善して消化管腔内の *Bifidobacterium* を増加させることが報告されている^{55,56)}。この実験データが根拠となって IMO は特定保健用食品の関与成分として認可されている。しかしながら、奥らは同じ特定保健用食品の関与成分として認可されているフラクトオリゴ糖 (FOS) をヒトに摂取させると、腸内細菌によって産生される水素ガスが FOS 摂取では 2 時間前後から呼気に排出されはじめて、3-4 時間でピークになるのに対し、IMO 摂取では水素ガスはほとんど排出されないことを報告している⁵⁷⁾。IMO が消化されないのであれば FOS と同様に小腸で消化・吸収されずに大腸へ到達して腸内細菌によって資化されて水素ガスを産出し、呼気へ排出するはずである。また、FOS の一過性の高浸透圧性下痢に対する最大無作用量は体重 1 kg あたり 0.3-0.4 g であるのに対して、IMO は体重 1 kg あたり 1.2 g 以上で、消化されない他のオリゴ糖に比べて非常に高いことを報告している⁵⁸⁾。一過性の高浸透圧性下痢に対する最大無作用量が高いことは、IMO が消化されて大腸へ到達する量が FOS などに比べて少ないことを意味している。つまり、難消化性の FOS とは異なり、IMO は小腸で消化・吸収されるため、大量に摂取しないと大腸へ到達して腸内細菌によって発酵されないことを示している。IMO は特定保健用食品の関与成分とされているため一般的には難消化性オリゴ糖とされているが、上記の結果より、IMO は難消化性ではないことになる。

ところが、栄養表示基準制度で難消化性オリゴ糖定量法として認可されている AOAC 2001.03 法（酵素-HPLC 法）で IMO を定量すると、上記したような *in vivo* の実験結果とは異なり、未水解物として定量されることが常広らによって報告されている⁵⁹⁾。この結果は、AOAC 2001.03 法（酵素-HPLC 法）に用いられている水解酵素では、ヒト小腸粘膜酵素で消化される糖質が水解されないために、これらを難消化性オリゴ糖として誤って定量されることを示している。これは今後、新たに開発されるオリゴ糖に関しても誤って難消化性オリゴ糖として定量する問題を内在していることにつながる恐れがある。それゆえ、本研究では、AOAC 2001.03 法の難消化性オリゴ糖定量における妥当性を再検討することにした。

一方、Prosky 法では定量できない難消化性オリゴ糖などの食物繊維素材の個別定量法として AOAC 997.08 法（イヌリンならびに FOS 定量法）^{60,61)}、AOAC 2000.11 法（ポリデキストロース定量法）⁶²⁾、AOAC 2001.02 法（ガラクトオリゴ糖（GOS）定量法）⁶³⁾、AOAC 2001.03 法（RMD 定量法）⁵⁴⁾、AOAC 2002.02 法（レジスタントスターチ（RS）定量法）⁶⁴⁾が AOAC INTERNATIONAL を中心に研究・開発され、公表された。

わが国においても、加工食品の栄養成分表示を目的に各オリゴ糖開発メーカーならびに日本健康・栄養食品協会が定めた独自の個別定量法を用いて各難消化性オリゴ糖を定量している⁶⁵⁻⁷⁰⁾。しかしながら、対象とするオリゴ糖の種類によって定量法を変更することは、分析が煩雑になるだけでなく、多大な時間を要すると共に作業効率を著しく低下させることが問題視されている⁷¹⁾。また、AOAC によって定められた個別定量法を採用しない場合、同一のオリゴ糖を定量しても AOAC 個別定量法で定量した結果と直接比較することはできない。難消化性オリゴ糖は拡大した食物繊維の定義の範疇に含まれるにもかかわらず、単一の難消化性オリゴ糖定量法は存在しない。このことは食物繊維摂取量を正確に把握できないために栄養評価においても問題が生じることにつながる。それゆえ、申請者は食物繊維の定義に包括された成分、とくに、難消化性オリゴ糖を簡便かつ正確に定量できる定量法の確立は食物繊維研究における急務な課題の一つと考えている。

国民の健康に対する関心が高い現代においては、様々な健康効果が期待できる難消化性オリゴ糖や食物繊維を利用した様々な食品が市場に出回っている。平成 26 年 2 月 19 日現在では、特定保健用食品は 1,094 品目が認可されている。食物繊維ならびに難消化性オリゴ糖などの難消化性糖質が関与したそれらは全体の約 50%を占めている⁷²⁾。また、いわゆる健康食品だけでなく、乳児対象の調製粉乳をはじめとして一般加工食品にも種々の難消化性糖質は使用され商品化されている。とくにオリゴ糖を飲食品に用いる場合に最も利用されるのは、嗜好・食感機能などの色、味、香り、歯ごたえ、舌触りなど食べた時においしさを感じる第二次機能の付与である。現在、様々なオリゴ糖素材が、独自の多種多様な第二次機能を有していることから飲食品に用いられており、その用途は主に飲食品への味質付与ならびに保存性の向上である⁷³⁾。オリゴ糖の特性の多くは、重合度と深い関わりがあり、重合度が、粘度、甘味度、着色性、浸透性、氷点降下、皮膜形成能、水分活性に関連していることが明らかにされている⁷³⁾。オリゴ糖という言葉が流布されるようになって数十年、日本ほど数多くのオリゴ糖製品が世に出ている国はない⁷³⁾。これは、オリゴ糖を製造する上で欠かせない酵素研究が盛んであることを始めとし、オリゴ糖に対する一般消費者の知識や信頼性が高いこと、様々なオリゴ糖の味質や機能が理解および評価されているからである。また、食物繊維の定

義の変遷または、ルミナコイドの概念の提案によって難消化性オリゴ糖の機能性に関心が高まってきた。それゆえ、オリゴ糖の食品への用途が拡大する近年では、開発されたオリゴ糖に機能性を有しているか否かを正確に評価することは要用である。

消費者が難消化性オリゴ糖含有食品を選択する際に、期待する健康効果が得られるような正確な食品成分表示を実現させるには、正確な難消化性オリゴ糖定量法は不可欠である。多種多様な難消化性成分を包括する難消化性糖質の定量法を提案することは、栄養表示ならびに摂取量の評価などの面からも必須であり、また国際的な見地からも極めて重要である。さらに、難消化性オリゴ糖の簡便かつ正確な定量法の確立は、個人あるいは集団の食物繊維摂取量の計算や栄養素摂取状況の評価を適正に行い、生活習慣病予防をはじめとした健康の保持・増進への寄与など、実践的な栄養学の側面からも重要であると考えられる。それゆえ、食品中の食物繊維ならびに難消化オリゴ糖を正確に定量する重要性は拡大の一途をたどっている⁵¹⁾。また、食品産業は、新たな糖質の開発を今後進めることが予想されるため、このような新しい食品素材に対応できる定量法の開発も必要である。可能であれば、単一の簡便な定量法で、多種類の難消化性オリゴ糖の定量ができることが望ましく、これらの課題を少しでも解決することが求められている⁵¹⁾。

現在、Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses (CCNFSDU) ならびに European Union (EU) で難消化性オリゴ糖の DP を 3 から 9 としているが、その背景には糖類 (sugars) の定義との関連があると推察される⁷⁴⁾。健康増進法における糖類の定義は、単糖および二糖に限定し、消化・吸収されにくい糖アルコールを含まないことになっている⁷⁵⁾。消化されないラクチュロースやセロビオースは二糖であるので糖類の定義に該当する。しかし、糖類の定義は、消化吸収されて生体利用されるブドウ糖や果糖などの単糖ならびにショ糖やマルトースなどの二糖を想定しているため、糖類の定義は矛盾していることになる。米国や EU が糖類の定義を提示した当時、難消化性二糖などが食品素材として使用されることを想定しなかったため、このような矛盾した結果を招くことになったものと思われる。厚生労働省は米国や EU の糖類の定義をそのまま用いているが、今のところの改定の動きはみられない。しかしながら、今後、難消化性二糖などについても考慮した糖類ならびに難消化性オリゴ糖の定義の改定を実施する必要があることが提案されている⁷⁶⁾。一方、International Union of Biochemistry and Molecular Biology- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUB-IUPAC) におけるオリゴ糖の定義では DP は 2 からとされている^{77,78)}。したがって、CODEX ならびに EU の難消化性オリゴ糖の定義に糖類が関連していたとしても、難消化性のオリゴ糖だけ DP の定義が 2 からでなく、3 にすることには矛盾がある。また、既に食品へ利用されているラクチュロースならびにセロビオースを難消化性オリゴ糖の定義から除外した場合、それらの分類が不明瞭になる問題も生じる。この難消化性オリゴ糖の DP の定義に関する問題は、IUB-IUPAC が定めているオリゴ糖の DP は 2 からと定義に基づくことで解決すると申請者は考えている。また、日本においては難消化性オリゴ糖の定義は DP を 2 から 9 としているため⁷⁶⁾、申請者はこれらの事実を踏まえて難消化性オリゴ糖の DP は 2 からとした^{79,80)}。

本研究の最終目的は、消費者に正確な健康情報を与えることができる難消化性糖質の正確な定量法を開発することである。そのため、本研究では、AOAC 公定法として認可されている AOAC 2001.03 法ならびに AOAC 2009.01 法の酵素-HPLC 法 (難消化性オリゴ糖定量法) を用いた難消化

性オリゴ糖定量に焦点をあて、この定量法では難消化性オリゴ糖を正確に定量できないことを実証し、その要因を明らかにすると共に、それらの問題点を解決した AOAC 2009.01 法を基にした正確な難消化性オリゴ糖定量法の確立を試みた。

II. 実験材料ならびに方法

1. AOAC 2001.03 法によるオリゴ糖定量の問題点と解決策の検討

1) AOAC 2001.03 法によるオリゴ糖定量の問題点の検証

(1) 試験物質

本研究では、すでに食品素材として特定保健用食品をはじめ健康志向食品に使用されている食物繊維、難消化性オリゴ糖を使用した。また、消化性オリゴ糖も試験物質として使用した。食物繊維として RMD を用い、難消化性オリゴ糖として FOS を用いた。消化性オリゴ糖として IMO、スクロースならびにラクトースを用いた。IMO は特定保健用食品の関与成分であることから公的には難消化性オリゴ糖として認可されているが、これまで報告された *in vivo* の実験結果から消化性オリゴ糖であることが明らかであるため、本学位論文では消化性オリゴ糖として取り扱うことにした。

本研究で用いた食物繊維である RMD は松谷化学工業（株）（兵庫県）から供与されたものでその純度は 93.7% である。なお、本研究では、RMD は 78% エタノールで沈殿しない低分子画分を分析対象とした。本研究に用いた難消化性オリゴ糖である FOS の純度は 98% 以上で、1-kestose (GF₂) 36.8%、nystose (GF₃) 51.9%、1^F-β-fructofuranosyl nystose (GF₄) 9.3% で、残りの 2% はグルコースとフラクトースで構成された複合糖で、平均分子量は 610.1 である。FOS は明治製菓（株）（現・株式会社 明治、東京都）から供与されたものである。

本研究で用いた消化性オリゴ糖の IMO の純度は 90.8% 以上で、平均分子量は 453.9 で、イソマルトテトラオース、イソマルトシルマルトース、イソマルトトリオース、パノース、イソマルトース、マルトースなどの混合物である。IMO は昭和産業（株）（東京都）から供与されたものである。スクロースは純度が 98% 以上で、和光純薬工業（株）（大阪府）から購入したものである。また、ラクトースは純度 98% 以上で、明治乳業（株）（東京都）から供与していただいたものである。

(2) 試薬

AOAC 2001.03 法による難消化性オリゴ糖定量には、AOAC 2001.03 法の食物繊維測定キットである TOTAL DIETARY FIBRE ASSAY KIT (Megazyme International Ireland, Ltd., Ireland) を使用した。この測定キットには、*Bacillus licheniformis* 由来の耐熱性 α-アミラーゼ、*Bacillus licheniformis* 由来のプロテアーゼならびに *Aspergillus niger* 由来の AMG が用いられている。イオン交換樹脂はアンバーライト MB-4 (オルガノ (株)、東京都) を用いた。また、セライトはキシダ化学(株)(大阪府) から購入して用いた。

(3) AOAC 2001.03 法によるオリゴ糖定量の手順

AOAC 2001.03 法指定の加水分解酵素を用いた酵素-HPLC 法によるオリゴ糖定量のフローチャートを Fig. 3 に示した。AOAC 2001.03 法を用いたオリゴ糖の定量ならびに各糖質の未水解低分子画分の回収率の算出は、Ohkuma らの方法⁵⁴⁾を一部改変した Tanabe らの方法⁷⁹⁾に準じた。

HPLC を用いた各糖質定量のための分析条件は以下のとおりである。

測定機器	LC-20AD (株) 島津製作所、京都府)
ガードカラム	SUGAR KS-G (株) 島津製作所、京都府)
カラム	Shodex SUGAR KS-802 (8.0 φ×300 mm, 昭和電工 (株)、東京都)
カラム温度	70℃
移動相	H ₂ O
流速	0.5 mL/min
試料流入量	10 μL
検出器	示差屈折計 RID-10A (株) 島津製作所、京都府)

回収率は 1 サンプルにつき、duplicate で分析し、その平均値とした。以下の計算式より各糖質の未水解画分の回収率を算出した。

$$\text{分析試料中の未水解糖質画分の回収率 (\%)} = \frac{\text{PA-Nondigestible oligosaccharide}}{\text{PA-Non-treatment}} \times \frac{1}{\text{SW}} \times 100$$

PA-Nondigestible oligosaccharide: 試料から得られた HPLC のピークエリア

PA-Non-treatment: 盲検試料の HPLC ピークエリア

SW: 試料重量 (g)

2) 給源の異なる低分子糖質水解酵素を用いたオリゴ糖の水解能の比較・検討

(1) ブタならびにヒトの小腸粘膜二糖類水解酵素活性の比較

① 試験物質

試験物質は、難消化性である FOS、RMD、ガラクトシルスクロース (GS)、ラクチュロース、GOS およびセロビオースを 56 mM になるように 50 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) に溶解した。また、対照として消化性のスクロースならびに IMO を用いた。本研究に用いた FOS の純度は 98% 以上で、明治製菓 (株) (現・株式会社 明治、東京都) から供与されたものである。RMD は松谷化学工業 (株) から供与されたものでその純度は 93.7% である。GS の純度は 97% 以上で、分子量は 504.6 の三糖である。GS は塩水港精糖 (株) (東京都) から供与されたものである。ラクチュロースの純度は 99% 以上で、分子量は 342.4 の二糖で、森永乳業 (株) (東京都) から供与されたものである。GOS の純度は 90% 以上で、日新製糖 (株) (東京都) から供与されたものである。セロビオースの純度は 99% 以上で、分子量は 342.4 の二糖である。セロビオースは松谷化学工業 (株) から供与されたものである。

② ブタ小腸粘膜ホモジネートの調製

長崎県諫早食肉衛生検査場 (長崎県、諫早市) より供与されたブタ小腸 (雑種ブタ (LWD 種)、雄性、6 ヶ月齢成体) は、氷冷したバット上で小腸に付着している脂肪などを丁寧に切り離した後、十二指腸ならびに回腸を切り離し、二糖類水解酵素活性が高い空腸上部 (空腸約 1/2) を 10 cm 間

隔に分割した。切り分けた小腸は、氷冷ガラスプレート上で縦に切り開き、小腸管腔内を生理食塩水で 2、3 度洗浄後、ペーパータオルで水滴を除去した。その後、小腸を広げた状態で積み重ね、ブタ小腸粘膜ホモジネートの調製まで -80°C で保存した。

-80°C に保存していたブタ小腸組織片は、ホモジネート調製前に一晚冷蔵庫内に静置して解凍した。解凍したブタ小腸組織片は、ペーパータオルで水滴を除去し、氷冷したガラスプレート上にてスクレーパーを用いて小腸粘膜を剥離した。得られた小腸粘膜は秤量後、生理食塩水を 19 倍容量 (5%) 加え、ポリトロン (Kinematica Co., Ltd, Swiss) を用いて氷冷下で 30 秒間、2 回均一化した。この 5%ホモジネート約 1 mL をプラスチックチューブ (1.25 mL 容) に分注して実験に供するまで -80°C で凍結保存した。

③ヒト小腸粘膜ホモジネートの調製

ヒト小腸組織片は、がん等の手術時に摘出したものを実験に供するまで -80°C で凍結保存した。ヒト小腸組織片は異なる病因による手術時に摘出したものであり、標本によって小腸組織部位が著しく異なった。ヒト小腸粘膜ホモジネートは、Oku らの方法⁸¹⁾に準じて用いて調製し、実験に供するまで -80°C で凍結保存した。

④二糖類水解酵素活性の測定

二糖類水解酵素活性の測定は、グルコースオキシダーゼを用いた Dahlqvist の方法⁸²⁾を一部改変した Oku らの方法⁸³⁾で行った。基質にはスクロース、マルトース、トレハロース、ラクトース、パラチノースならびにイソマルトースを用いて各二糖類水解酵素活性を測定した。各基質溶液は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にそれぞれの基質を溶解して 56 mM になるように調製した。各酵素の比活性は 1 時間あたりタンパク質 1 mg で加水分解された基質量を μmole 数 ($\mu\text{moles of substrate hydrolyzed/mg protein/h}$) で表した。

⑤タンパク質濃度の測定

ブタならびにヒト小腸粘膜ホモジネートのタンパク質濃度は、色素を用いる Bradford 法⁸⁴⁾に準じて測定した。タンパク質標準液にはウシ血清アルブミンを用いた。

(2) ブタならびにヒトの小腸粘膜酵素で処理したオリゴ糖水解物の分離・同定

タンパク質濃度が反応系で同濃度になるよう予め希釈・調製したブタならびにヒト小腸粘膜ホモジネート 0.1 mL を小試験管 (10 mL 容) に分注し、これに調製した各基質 0.1 mL を加え、 37°C で 1 時間反応させた。反応後、沸騰水浴中で 5 分間酵素を加熱失活させ、室温まで冷却した。この反応液はメンブレンフィルター (Millex-GV Non-Sterile $0.22\ \mu\text{m}\times 13\ \text{mm}$, Millipore Co., USA) を用いてタンパク質などの不純物をろ過し、分析試料とした。また、盲検として、適当に希釈したブタならびにヒト小腸粘膜ホモジネート 0.1 mL を小試験管 (10 mL 容) に分注した後、沸騰水浴中で 5 分間酵素を加熱失活させ、室温まで冷却した。これにそれぞれ基質溶液 0.1 mL を加え、上記と同様に処理したものを盲検試料とした。HPLC の分析条件ならびに未水解画分の回収率の算出は前述

と同様にした。

(3) *Aspergillus niger* 由来の α -グルコシダーゼで処理したオリゴ糖水解物の分離・同定

FOS または IMO 1.0000 g \pm 0.0001 g を秤量し、ビーカー (100 mL 容) に入れ、0.08 M リン酸緩衝液 (pH 6.3) 20 mL で溶解した。溶解後、トランスグルコシダーゼ L「アマノ」 (*Aspergillus niger* 由来 α -グルコシダーゼ、天野エンザイム (株)、愛知県) 1 mL (300,000 U/mL) を添加し、60°C で 30 分間反応させた。反応後、沸騰水浴中で 5 分間酵素を失活させ、室温まで冷却した。その後、メスシリンダーを用いて 50 mL に定容し、メンブレンフィルターを用いてろ過し、HPLC の分析試料とした。HPLC の分析条件ならびに未水解画分の回収率の算出は、前述と同じである。

(4) *Bacillus circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼで処理したオリゴ糖水解物の分離・同定

ラクチュロースまたはラクトース 1.0000 g \pm 0.0001 g を秤量し、ビーカー (100 mL 容) に入れ、0.08 M リン酸緩衝液 (pH 4.5) 20 mL で溶解した。溶解後、ラクトレス L3 (*Bacillus circulans* 由来 β -ガラクトシダーゼ、大和化成 (株)、滋賀県) を 1 mL (3,100 U/mL) 添加し、60°C で 30 分間反応させた。反応後、沸騰水浴中で 5 分間酵素を失活させ、室温まで冷却した。その後、メスシリンダーを用いて 50 mL に定容した。その後、メンブレンフィルターを用いてろ過して HPLC の分析試料とした。HPLC の分析条件および未水解画分の回収率の算出は前述の通りである。

3) AOAC 2001.03 法の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した難消化性オリゴ糖定量法の妥当性の検討

(1) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の調製

ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液 (ブタ小腸粘膜 BBMV) の調製は Kessler らの方法⁸⁵⁾を一部改変した Tanabe らの方法⁷⁹⁾に準じて行った。ブタ小腸粘膜 BBMV は、実験に供するまで -80 °C で凍結保存した。

(2) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液のタンパク質濃度の測定

前述の方法を用いてブタ小腸粘膜 BBMV のタンパク質濃度を測定した。

(3) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の α -グルコシダーゼ unit 量の測定

ブタ小腸粘膜 BBMV の α -グルコシダーゼ活性 unit は Halvolson の方法⁸⁶⁾に準じて測定した。ブタ小腸粘膜 BBMV の α -グルコシダーゼ活性 unit は、タンパク質 1 mg あたりに 1 分間に *p*-ニトロフェノール 1 μ mol を生成する酵素量 (unit/mg protein) として表した。

(4) AOAC 2001.03 法の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した難消化性オリゴ糖定量法の手順

AOAC 2001.03 法指定の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した難消化性オリゴ糖定量法

の手順は Fig. 4 に示した。AOAC 2001.03 法の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した難消化性オリゴ糖定量法の手順ならびに各糖質の未水解低分子画分の回収率の算出は、Tanabe らの方法⁷⁹⁾で行った。HPLC の分析条件は前述と同じである。食物繊維として RMD を用い、難消化性オリゴ糖として FOS を用いた。消化性糖質として IMO、スクロースならびにラクトースを用いた。

2. AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点とその要因の検証

1) AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点の検証

(1) 試験物質

本実験に用いたオリゴ糖 (DP 2 から 9) は、小腸粘膜酵素によって消化されるもの (消化性オリゴ糖)、およびきわめて消化され難いもの (難消化性オリゴ糖) である。試料は、すでに商品化されて市場に出回っているものとした。難消化性オリゴ糖として FOS、GOS ならびにラフィノースを用いた。また、構成糖や結合様式が異なる消化性オリゴ糖としてスクロース、パラチノース、カップリングシュガー[®]、マルトトリオース、パノースおよび IMO を用いた。本実験に用いたオリゴ糖の消化性、構成糖ならびに結合様式などをまとめたものが Table 2 である^{57, 87-96)}。

本研究に用いた難消化性の FOS の純度は 98%以上で、明治製菓 (株) (現・株式会社 明治、東京都) から供与されたものである。GOS の純度は 90%以上で、分子量は 504.6 の三糖である。GOS は日新製糖 (株) (東京都) から供与されたものを実験に用いた。ラフィノースの純度は 98%以上で、分子量は 504.6 で三糖である。ラフィノースは和光純薬工業 (株) (大阪府) から購入した。

本研究で用いた消化性のパラチノースの純度は 98%以上で、分子量は 342.4 の二糖である。パラチノースは三井製糖 (株) (東京) から供与されたものである。カップリングシュガー[®]の純度は 98%以上で、スクロースのグルコース残基にグルコース数分子が α -1,4 結合したスクロース、グルコシルスクロースならびにマルトシルスクロースなどの混合物で、平均分子量は 601.7 である。カップリングシュガー[®]は (株) 林原生物化学研究所 (岡山県) より提供していただいたものを実験に供した。パノースの純度は 99.5%以上で、分子量は 504.6 の三糖である。パノースは、(株) 林原生物化学研究所 (岡山県) から供与していただいたものを実験に供した。IMO の純度は 90.8%以上で昭和産業 (株) (東京都) から供与されたものである。スクロースは純度が 98%以上で、和光純薬工業 (株) (大阪府) から購入した。また、マルトトリオースは純度が 95%以上で、シグマアルドリッチジャパン合同会社 (東京都) より購入したものを実験に供した。

(2) 試薬

AOAC 2009.01 法による難消化性オリゴ糖定量には、AOAC 2009.01 法指定の食物繊維測定キットである INTEGRATED TOTAL DIETARY FIBRE ASSAY KIT (Megazyme International Ireland, Ltd., Ireland) を使用した。この測定キットには、ブタ膵臓 α -アミラーゼ、*Aspergillus niger* 由来の AMG ならびに *Bacillus licheniformis* 由来のプロテアーゼが用いられている。

(3) AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の手順

AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の実験のフローチャートを Fig. 5 に示した。AOAC 2009.01

法を用いたオリゴ糖の定量ならびに各糖質の未水解オリゴ糖画分の回収率の算出は、McCleary らの方法⁷⁹⁾を一部改変した Tanabe らの方法⁸⁰⁾で行った。HPLC の分析条件ならびに回収率の算出方法は、前述した AOAC 2001.03 法を用いた定量と同様に行った。

2) AOAC 2009.01 法に用いられているアミログルコシダーゼによるオリゴ糖水解能の検証

(1) アミログルコシダーゼならびにヒト小腸粘膜酵素によるオリゴ糖水解能の比較

①試験物質

小腸粘膜酵素で消化されないオリゴ糖として FOS、GOS、ラフィノースを用い、消化されるオリゴ糖としてスクロース、パラチノース、トレハロース、マルトトリオースならびに IMO を用いた。これらの基質濃度が 56 mM になるように 50 mM マレイン酸緩衝液 (2 mM 塩化カルシウム、0.02 % アジ化ナトリウム含有、pH 6.0) に溶解させた。

②ヒト小腸粘膜ホモジネートの調製

前述した調製方法と同様にして 5 % ヒト小腸粘膜ホモジネートを調製した。

③タンパク質濃度の測定

前述した方法を用いてタンパク質濃度を測定した。

④ α -グルコシダーゼ unit 量の測定

前述の方法を用いて AMG ならびにヒト小腸粘膜ホモジネートの α -グルコシダーゼ活性 unit を測定した。

⑤オリゴ糖の水解実験の手順

α -グルコシダーゼ unit 量が 0.092 unit/mL になるよう適当に希釈した酵素溶液 0.1 mL を小試験管 (10 mL 容) に分注した。予備加温を行った後、調製した 56 mM の各基質溶液 0.1 mL を入れ、37°C で 16 時間反応させた。反応後、沸騰水浴中で 5 分間酵素を失活させ、室温まで冷却した。この反応液は、メンブレンフィルターを用いてろ過し、分析試料とした。また、盲検として α -グルコシダーゼ unit 量が同量になるように適当に希釈した両酵素 0.1 mL を小試験管 (10 mL) に分注した後、沸騰水浴中で 5 分間酵素を加熱失活させ、室温まで冷却した。これに 56 mM の各基質溶液を同量加え、37°C で 16 時間反応させた。その後、メンブレンフィルターを用いてろ過し、HPLC の分析試料とした。HPLC を用いた各糖質定量のための分析条件ならびに各糖質の未水解オリゴ糖画分の回収率の算出方法は前述と同様である。

(2) アミログルコシダーゼの添加量とオリゴ糖水解能の検討

①試験物質

試験物質は、消化性糖質として IMO ならびにスクロースを用いた。

②ブタ膵 α -アミラーゼおよびアミログルコシダーゼの酵素混合溶液の調製

AMG 添加量増加に伴い消化性糖質の未水解物の回収率が減少するかを検討するため、AOAC 2009.01 法の酵素混合溶液中のブタ膵臓由来の α -アミラーゼ (50 unit/mL、ブタ由来) は一定にし、AMG 添加量を増やした酵素混合溶液を以下の割合で調製した。調製した酵素混合溶液の割合は Table 3 に示す。4 種類の割合の AMG と一定量の α -アミラーゼをそれぞれ混合した酵素溶液は、50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6.0、2 mM 塩化カルシウムならびに 0.02%アジ化ナトリウム含有) に溶解して調製した。

③アミログルコシダーゼを用いた AOAC 2009.01 法において生成されるオリゴ糖水解物の同定

AMGを用いた AOAC 2009.01 法において生成されるオリゴ糖水解物の同定は、前述した McCleary らの方法⁹⁷⁾を一部改変した Tanabe らの方法⁸⁰⁾で行った。

3. AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変法の提案と検証

1) AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変法における酵素添加量の検討

(1) 試験物質

消化性糖質であるスクロース、IMO ならびに可溶性デンプンを用いた。

(2) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の調製

前述した方法を用いてブタ小腸粘膜 BBMV の調製を行った。得られた沈殿物 (精製した刷子縁膜) を適当量の 50 mM マレイン酸緩衝液 (2 mM 塩化カルシウムならびに 0.02%アジ化ナトリウム含有、pH 6.0) で懸濁後、10 mL 用プラスチックチューブに分注し、実験に供するまで -80°C で凍結保存した。

(3) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液のタンパク質濃度の測定

前述の方法を用いてブタ小腸粘膜 BBMV のタンパク質濃度を測定した。

(4) ブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の α -グルコシダーゼ unit 量の測定

前述の方法を用いてブタ小腸粘膜 BBMV の α -グルコシダーゼ unit 量を測定した。

(5) ブタ膵 α -アミラーゼならびにブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の混合酵素溶液の調製

AOAC 2009.01 法の酵素混合溶液中のブタ膵臓由来の α -アミラーゼ(50 unit/mL、ブタ由来)は一定にし、ブタ小腸粘膜 BBMV (タンパク質濃度: 7.8 mg/mL) の α -グルコシダーゼ unit 量の添加する割合を増やした酵素混合溶液を調製した。調製した酵素混合溶液の割合については Table 4 に示

す。11種類の割合の酵素混合溶液は、50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6.0、2 mM 塩化カルシウムならびに 0.02% アジ化ナトリウム含有) に溶解して調製した。

(6) ブタ胰 α -アミラーゼならびにブタ小腸粘膜刷子縁膜懸濁液の混合酵素溶液で処理したオリゴ糖水解物の分離・同定

ブタ胰 α -アミラーゼならびにブタ小腸粘膜 BBMV の混合酵素溶液で処理したオリゴ糖水解物の分離・同定は前述した McCleary らの方法⁹⁷⁾を一部改変した Tanabe らの方法⁸⁰⁾で行った。

2) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖定量の妥当性の検証

(1) 試験物質

AMG をブタ小腸粘膜 BBMV に代替した定量法を本学位論文では AOAC 2009.01 法を基にした改良変法 (酵素-HPLC 法による改良変法) とした。酵素-HPLC 法による改良変法を用いた難消化性オリゴ糖定量における妥当性評価を行うために、以下の試験物質を用いた。

試験物質は AOAC 2009.01 法を用いたオリゴ糖定量で採用した難消化性および消化性オリゴ糖を使用した。難消化性オリゴ糖として FOS、GOS ならびにラフィノースを用いた。また、消化性糖質としてスクロース、パラチノース、カップリングシュガー[®]、マルトトリオース、パノースおよび IMO を用いた。

酵素-HPLC 法による改良変法の定量結果の再現性を評価するため、FOS の構成成分の一つである三糖類の 1-ケストース (GF₂) を用いた。GF₂ の分子量は 504.4 で、純度は 98.9% であった。

また、難消化性オリゴ糖が含有していない市販クッキーにオリゴ糖を加えて乳鉢で均一に混合し、これをオリゴ糖含有モデル食品として試験物質にした。混合させる難消化性ならびに消化性オリゴ糖は FOS、GOS、ラフィノース、IMO およびスクロースの 5 種類とした。オリゴ糖含有モデル食品の調製は以下のように行った。購入した「MOON LIGHT[®]」(クッキー、森永製菓 (株)、東京) を乳鉢で破碎し、均一にした後、クッキーを 9.0000 g 正確に秤量した。その後、オリゴ糖を 1.0000 g を正確に秤量し、秤量したクッキーならびにオリゴ糖を乳鉢内で均一にした。いずれのオリゴ糖含有クッキーも【クッキー : オリゴ糖 = 9 : 1】の割合になるようにして 10%オリゴ糖含有クッキーを調製した。

さらに、難消化性オリゴ糖が関与成分である特定保健用食品ならびにいわゆる健康食品を購入して試験物質として用いた。加工食品の成分表示については Table 5 に示した。試験物質として用いた加工食品は以下に示す。

- (1) 「日本オリゴのフラクトオリゴ糖」(100 g 中 FOS 40 g 含有、シロップ状、日本オリゴ (株)、富山県)
- (2) 「ハイオリゴ」(100 g 中 GOS 44.4 g 含有、シロップ状、(株) K ライズ、群馬県)
- (3) 「天寿りんご黒酢」(100g 中 GOS 17.0g 含有、液体、坂元醸造 (株)、鹿児島県)
- (4) 「昭和オリゴタイムシロップ」(100 g 中 IMO 63.0 g 以上含有、シロップ状、昭和産業(株)、東京都)
- (5) 「エコライフ」(100 g 中 IMO 19.0 g 含有、乳酸菌飲料、(株) ミル総本社、京都府)

- (6) 「北海道 てんさいオリゴ糖」 (100 g 中ラフィノース 9.4 g 含有、シロップ状、(株)加藤美蜂園本舗、神奈川県)
- (7) 「ウィズオペレ」 (100 g 中 GOS 2.5 g 含有、炭酸飲料、ゼリア新薬工業(株)、東京都)
- (1) ~ (6) の加工食品は、いずれも開封後、そのまま試験物質として用いた。(7) ウィズオペレのみ、超音波装置 (US-105、(株)エスエヌディ、長野県) を用いて脱気処理後、試験物質として用いた。

(2) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法によるオリゴ糖定量の手順

AOAC 2009.01 法を基にした改良変法によるオリゴ糖定量の手順ならびに未水解オリゴ糖画分の定量値の算出は、Tanabe らの方法⁸⁰⁾で行った。ブタ膵臓由来の α -アミラーゼ (50 unit/mL、ブタ由来) とブタ小腸粘膜 BBMV (α -グルコシダーゼ unit 量として 2,720 unit/mL) を 50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6.0、2 mM 塩化カルシウムならびに 0.02% アジ化ナトリウム含有) 40 mL に予め調製した酵素溶液として実験に供した。

また、酵素-HPLC 法による改良変法のオリゴ糖の定量結果の日差の再現性 (精度) の評価は、GF₂ ならびにオリゴ糖含有市販加工食品を試料にして、試験室、試験者、装置、器具および試薬の製造ロットを変えることなく、定量操作を実施する日を変えて、未水解物として定量される分析値の平均値と標準偏差 (SD) を算出した。平均値の差の統計解析は、1 サンプルの *t* 検定を行った。また、定量結果の再現性を評価するため、相対標準偏差ならびに標準偏差の 95% 信頼区間を評価した。解析には IBM SPSS statistics 20 (日本アイ・ビー・エム (株)、東京) を用い、有意確率は 5% 未満とした。

難消化性オリゴ糖を含有した特定保健用食品ならびにいわゆる健康食品中の難消化性オリゴ糖量の定量値は、100 g あたりの重量 (g/100 g) で表した。AOAC 2009.01 法の低分子未水解画分の定量値の算出方法に従い、あらかじめ定量係数を求めた。グルコース 1.0000 g を正確に秤量し、水解酵素の代わりに緩衝液を加えて盲検を行った。その後盲検によって得られた試料を 100 mL に水で定容後、HPLC で分析し、定量係数 (補正係数) を以下の式より算出した。

$$\text{定量係数} = \frac{\text{PA-Glucose}}{\text{PA-Internal}}$$

PA-Glucose: グルコース標準試料の HPLC ピークエリア (10 mg/mL)

PA-Internal: 盲検で得られた試料の HPLC ピークエリア (100 mL に定容した試料、理論値は 10 mg/mL)

酵素-HPLC 法による改良変法にて処理した試料の低分子の未水解画分の定量値は、以下の計算式より算出した。

$$\text{低分子の未水解画分の定量値} = \frac{\text{PA-Nondigestible oligosaccharide}}{\text{PA-Glucose}} \times \frac{1}{\text{SW}} \times \text{CON} \times \text{V} \times \text{Df} \times 100$$

(%)

PA-Nondigestible oligosaccharide: 酵素-HPLC 法による改良変法で処理した試料から得られた HPLC ピークエリア

PA-Glucose: グルコース標準試料の HPLC ピークエリア (10 mg/mL)

SW: 試料重量 (g)

CON: グルコース標準試料の濃度 (= 10 mg/mL)

V: HPLC 分析用試験液の定容量 (= 100 mL)

Df: 定量係数

4. 研究倫理委員会等の審査

ヒト小腸組織片を用いた消化実験は、長崎県立大学研究倫理審査委員会ならびに社会福祉法人十善会病院倫理審査委員会の承認を得て実施した。なお、手術により摘出したヒト小腸組織片を実験に使用することについては、手術前にそれぞれの患者にインフォームドコンセントを実施し、承諾を得た。

Ⅲ. 実験結果

1. AOAC 2001.03 法による難消化性オリゴ糖定量の問題点とその解決策の検証

1) AOAC 2001.03 法による難消化性オリゴ糖の定量

AOAC 2001.03 法指定の水解酵素を用いた酵素-HPLC 法によって定量した結果は Table 6 に示した。

ヒト消化酵素で一部消化される RMD およびほとんど消化されない FOS は、AOAC 2001.03 法指定の水解酵素でもほとんど水解されなかった。消化性糖質である IMO の未水解物は 2/3 が定量され、他の難消化性糖質に比べて低く、IMO の一部は AOAC 2001.03 法指定の水解酵素によりグルコースまで水解されていた。また、消化性糖質であるスクロースならびにラクトースは、AOAC 2001.03 法指定の水解酵素により、ほとんど水解されていなかった。

以上のことより、AOAC 2001.03 法指定の水解酵素である耐熱性 α -アミラーゼおよび AMG は、低分子のオリゴ糖を十分に水解できないことが明らかになった。

2) 給源の異なる低分子糖質水解酵素を用いたオリゴ糖水解能の比較・検討

AOAC 2001.03 法では、小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖を水解することができないため、消化性オリゴ糖が誤って難消化性オリゴ糖として定量される問題点が明らかになった。

そこで、AOAC 2001.03 法の酵素処理過程にさらに添加する低分子糖質水解酵素を検索するため、微生物および哺乳類由来の水解酵素を用いてオリゴ糖の水解実験を行うと共に、オリゴ糖定量に適した酵素の検討を行った。

(1) ブタならびにヒトの小腸粘膜二糖類水解酵素活性の比較

Table 7 は、ブタならびにヒト小腸粘膜ホモジネートの二糖類水解酵素の比活性ならびにそれぞれの酵素の相対的な比活性を比較するために、スクラーゼ活性を 1 とした時の各二糖類水解酵素の相対活性を算出し、さらにブタ小腸粘膜ホモジネートの各二糖類水解酵素に対するヒト小腸粘膜ホモジネートのそれらの相対比を示したものである。

実験結果から、ブタならびにヒト小腸粘膜ホモジネートの二糖類水解酵素比活性の相対比は類似していることが判明した。しかし、特徴としてブタ小腸粘膜ホモジネートの二糖類水解酵素比活性の相対比はヒト小腸粘膜ホモジネートと比較し、わずかであるがマルターゼが低く、ラクターゼは高かった。

(2) ブタならびにヒトの小腸粘膜酵素処理で生成したオリゴ糖水解物

Table 8 はブタならびにヒトの小腸粘膜ホモジネートを酵素標本として難消化性オリゴ糖ならびに低分子水溶性食物繊維の未水解物の残存率に差異が生じるか否かを比較・検討した結果である。

実験結果より、ブタ小腸由来の水解酵素は、ヒト小腸由来の水解酵素と同様に難消化性オリゴ糖をきわめて水解しにくいことが明らかになった。ブタ小腸粘膜酵素はヒト小腸粘膜酵素で消化されない糖質は水解せず、消化される糖質のみを水解していた。

(3) *Aspergillus niger* 由来の α -グルコシダーゼ処理で生成したオリゴ糖水解物

Fig. 6 は、*Aspergillus niger* 由来の α -グルコシダーゼを用いた難消化性オリゴ糖の水解後の HPLC のプロファイルを示している。

Aspergillus niger 由来の α -グルコシダーゼを用いて水解実験を行った結果、FOS はほとんどが水解され、難消化性オリゴ糖として HPLC で検出されなかった。また、IMO も FOS と同様に微生物由来の α -グルコシダーゼによって完全に水解された。

以上の結果、*Aspergillus niger* 由来の α -グルコシダーゼは難消化性の FOS を水解するため、難消化性オリゴ糖定量には不適當であることが判明した。

(4) *Bacillus circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼ処理で生成したオリゴ糖水解物

Fig. 7 は、*Bacillus circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼを用いてラクチュロースならびにラクトースを酵素処理後の HPLC の溶出プロファイルである。

Bacillus circulans 由来の β -ガラクトシダーゼによって、難消化性とされているラクチュロースは 65.5%がガラクトースとフラクトースに水解され、その未水解画分の回収率は 33.5%であった。また、ラクトースはほとんどが水解され、グルコースならびにガラクトースが遊離した (Fig. 6)。

以上の結果より、*Bacillus circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼは、消化性のラクトースだけでなく、難消化性のラクチュロースも水解したことから難消化性オリゴの定量には不適切であることが示された。微生物由来の水解酵素は、ヒト小腸由来の消化酵素でほとんど消化することができない FOS ならびにラクチュロースを水解した。

3) AOAC 2001.03 法の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した難消化性オリゴ糖の定量

AOAC 2001.03 法ならびに AOAC 2001.03 法の酵素処理反応系にブタ小腸粘膜酵素を添加した定量法を用いて未水解画分を定量した場合の HPLC プロファイルを Fig. 8、9、10、11 および Fig. 12 に示した。

RMD は AOAC 2001.03 法指定の加水分解酵素だけに比べると、低分子の画分が少し水解されており、その未水解物は、78.8%であった (Fig. 8)。FOS はブタ小腸粘膜 BBMV を酵素処理過程に添加しても、ほとんど水解されず、その未水解物は 92.1%であった (Fig. 9)。一方、IMO は酵素処理過程にブタ小腸粘膜 BBMV を加えることにより、検出限界以下まで水解され、その未水解物は定量されなかった (Fig. 10)。また、スクロース (Fig. 11) ならびにラクトース (Fig. 12) においても IMO と同様にブタ小腸粘膜 BBMV を酵素処理過程に添加することにより検出限界以下まで水解され、未水解物として定量されなかった。

2. AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点とその要因の検証

1) AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点の検証

Table 9 は AOAC 2009.01 法による各種オリゴ糖の定量結果である。難消化性オリゴ糖である FOS、

GOS ならびにラフィノースは、ほとんど水解されずに未水解画分として定量された。

一方、小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖を同様に定量した場合、グルコースの α -1,4 結合から成るマルトトリオースは大部分が水解され、わずかに未水解画分として定量された。同じくグルコースの α -1,4 および α -1,6 結合から成るパノースは約 2/3 が水解され、部分的に未水解画分として定量された。また、パノースと同様にグルコースの α -1,4 および α -1,6 結合をもつ IMO は一部しか水解されず、2/3 以上が未水解画分として定量された。グルコースおよびフルクトースを構成糖とするスクロースおよびパラチノースは、大部分が水解されず、それぞれ未水解画分として定量された。スクロースに比べて分子内にグルコースの α -1,4 結合が多いカップリングシュガー[®]は 2/3 が水解され、一部未水解画分として定量された。

AOAC 2009.01 法では、マルトトリオースを除いた消化性糖質が水解されずに難消化性オリゴ糖として定量された。

2) AOAC 2009.01 法に用いられているアミログルコシダーゼによるオリゴ糖水解能の欠陥の検証

AOAC 2009.01 法の低分子糖質に対する水解酵素として用いられている *Aspergillus niger* 由来の AMG は、上記したように小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖を完全に水解することができないため、消化されないオリゴ糖として定量されるという問題が明らかになった。そこで、この問題点が AMG に起因することを明らかにするため、2つの実験を実施した。まず、*Aspergillus niger* 由来の AMG の基質特異性について検討した。次に、AOAC 2009.01 法のオリゴ糖定量における AMG 添加量 (α -グルコシダーゼ添加 unit 量) の妥当性について検討した。

(1) アミログルコシダーゼならびにヒト小腸粘膜酵素によるオリゴ糖水解能の比較

Fig. 13 は、AOAC 2009.01 法の AMG ならびにヒト小腸粘膜ホモジネートを用いて、小腸粘膜酵素で消化されない FOS、GOS およびラフィノース、ならびに消化される IMO、マルトトリオース、スクロース、パラチノースおよびトレハロースの水解性を検討した結果である。

FOS、GOS、ラフィノースは AMG を用いた酵素処理によって 97.8%、99.8%ならびに 98.6%がそれぞれ未水解画分として回収された。ところが、難消化性オリゴ糖として扱われている IMO は 29.2%が未水解画分として回収され、他の難消化性オリゴ糖に比べて水解性は高かった。小腸粘膜酵素で消化されるマルトトリオースは、そのほとんどが水解され、わずか 5.4%が未水解画分として回収された。しかしながら、スクロース、パラチノースならびにトレハロースは、77.9%、97.2% および 100%が未水解画分としてそれぞれ回収され、小腸粘膜酵素で同じように消化されるマルトトリオースの水解の程度とは顕著に異なっていた。

ヒト小腸粘膜ホモジネートを用いて酵素処理をした結果、難消化性の FOS、GOS ならびにラフィノースの未水解画分の回収率は、94.6%、97.6%および 99.0%となり、AMG を用いた結果と同程度であった。IMO の未水解画分の回収率は 30.3%で、マルトトリオースの未水解画分の回収率は 9.3%であった。しかし、スクロース、パラチノースならびにトレハロースの未水解画分の回収率は 3.8%、34.7%および 14.4%で、AMG の結果とは明らかに異なっていた。以上の結果から、ヒト小腸粘膜酵素は構成糖や構造が異なる消化性オリゴ糖を容易に消化できるが、AMG は基質に対す

る特異性が強いために小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖であっても水解できないオリゴ糖が存在することを示唆している。

(2) アミログルコシダーゼの添加量とオリゴ糖水解能の検討

Fig. 14 は、AMG 添加量を増加した場合の IMO に対する水解能に及ぼす影響を示している。

IMO に対する水解能は、AMG 添加量に依存して高くなった。AOAC 2009.01 法における AMG 添加量(3.4 unit/mL)の未水解画分の回収率は 81%で、DP 4 画分の回収率は 13.0%、DP 3 画分は 23.0%、DP 2 画分は 45.3%ならびにグルコース画分は 18.7%であった。AOAC 2009.01 法における AMG 添加の 2 倍量 (6.8 unit/mL) では未水解画分の回収率は 76%で、DP 4 画分の回収率は 10.2%、DP 3 画分は 19.8%、DP 2 画分は 46.2%ならびにグルコース画分は 23.8%であった。AOAC 2009.01 法の AMG 添加の 4 倍量 (13.2 unit/mL) の未水解画分の回収率は 70%で、DP 4 画分の回収率は 7.6%、DP 3 画分は 16.0%、DP 2 画分は 46.9%ならびにグルコース画分は 29.5%であった。AOAC 2009.01 法の AMG 添加の 10 倍量(34.0 unit/mL)の未水解画分の回収率は 58%で、DP 4 画分の回収率は 3.6%、DP 3 画分は 8.8%、DP 2 画分は 45.3%ならびにグルコース画分は 42.3%であった。

スクロースは、AOAC 2009.01 法における AMG 添加量 (3.4 unit/mL) で処理した場合、未水解画分の回収率は 99.6%、2 倍量 (6.8 unit/mL) では 99.6%、4 倍量 (13.2 unit/mL) では 100.0%、10 倍量 (34.0 unit/mL) では 94.8%となり、AMG 添加量が増加してもスクロースの未水解画分の回収率にほとんど影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、AOAC 2009.01 法の AMG 添加量では α -グルコシダーゼ添加 unit 量が不十分であることが示された。

3. AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変法の提案と検証

1) AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変法における酵素添加量の検討

Fig. 15 は、ブタ小腸粘膜 BBMV 添加量の増加による IMO、スクロースならびに可溶性デンプンの水解性を評価したものである。

IMO は、ブタ小腸粘膜 BBMV 添加量に依存的して水解され、その未水解画分の回収率は、AOAC 2009.01 法 α -グルコシダーゼ unit 指定量 (3.4 unit/mL) 85.7%、2 倍量 (6.8 unit/mL) 83.1%、4 倍量 (13.2 unit/mL) 78.5%、10 倍量 (34.0 unit/mL) 70.4%、40 倍量 (136 unit/mL) 50.3%、200 倍量 (680 unit/mL) 20.0%、400 倍量 (1,360 unit/mL) 10.1%、600 倍量 (2,040 unit/mL) 7.0%、800 倍量 (2,720 unit/mL) 2.2%、1,000 倍量 (3,400 unit/mL) 1.8%ならびに 1,200 倍量 (4,080 unit/mL) 1.6%であった。IMO は 2,720 unit/mL (約 800 倍量) 添加することによりそのほとんどが水解され、それ以上添加量を増加してもその未水解画分の回収率には変化はなかった。

スクロースの未水解画分の回収率は、それぞれ AOAC 2009.01 法 α -グルコシダーゼ unit 指定量 (3.4 unit/mL) 93.9%、2 倍量 (6.8 unit/mL) 91.4%、4 倍量 (13.2 unit/mL) 84.7%、10 倍量 (34.0 unit/mL) 70.9%、40 倍量 (136 unit/mL) 20.5%、200 倍量 (680 unit/mL) 1.7%、400 倍量 (1,360 unit/mL) 1.1%、

600 倍量 (2,040 unit/mL) 0.9%、800 倍量 (2,720 unit/mL) 0.9%、1,000 倍量 (3,400 unit/mL) 0.9% ならびに 1,200 倍量 (4,080 unit/mL) 1.0%であった。スクロースは 1,360 unit/mL (AOAC 2009.01 法の約 400 倍量) 添加することによりそのほとんど水解され、ブタ小腸粘膜 BBMV 添加量をそれ以上増やしてもスクロースの未水解画分の回収率に変化はなかった。

可溶性デンプンの未水解画分の回収率は、AOAC 2009.01 法 α -グルコシダーゼ unit 指定量の 40 倍量 (136 unit/mL) 24.7%、200 倍量 (680 unit/mL) 15.1%、400 倍量 (1,360 unit/mL) 11.2%、600 倍量 (2,040 unit/mL) 11.1%、800 倍量 (2,720 unit/mL) 9.6%、1,000 倍量 (3,400 unit/mL) は 9.3%、1,200 倍量 (4,080 unit/mL) 9.2%であった。可溶性デンプンは 2,040 unit/mL (約 600 倍) 以上添加してもその未水解画分の回収率に影響を与えなかったが、一部水解されずに定量された。

以上の結果、IMO、スクロースならびに可溶性デンプンのいずれの消化性糖質も AMG を用いた場合とは異なり、酵素添加量に依存してそれらの残存率は減少した。また、難消化性オリゴ糖の酵素-HPLC 法による改良変法に用いる α -グルコシダーゼ unit 量は、いずれの消化性糖質においてもほとんど水解できる 2,720 unit (800 倍量) が妥当であることが示唆された。

2) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖定量の妥当性の検証

(1) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖の定量

AMG をブタ小腸粘膜 BBMV に代替した酵素-HPLC 法による改良変法ならびに AOAC 2009.01 法を用いてオリゴ糖を定量した場合の HPLC プロファイルを図 16、17 ならびに Fig. 18 に示した。AOAC 2009.01 法では、水解されなかったスクロースおよびパラチノースは、酵素-HPLC 法による改良変法によって水解され、それぞれ 3.3%ならびに 5.7%が未水解オリゴ糖として定量された。カップリングシュガー[®]も、酵素-HPLC 法による改良変法によってほとんどが水解され、わずか 1.9%が未水解オリゴ糖として定量された。

消化性のパノースならびに IMO においては酵素-HPLC 法による改良変法を用いることによって、ほとんどが水解され、それらは 1.9%および 4.9%が未水解オリゴ糖として定量された。また、消化性のマルトトリオースはほとんどが水解され、未水解オリゴ糖として 1.6%が定量された。マルトトリオースの定量結果は、AOAC 2009.01 法の定量結果と差異は観察されなかった。

難消化性である FOS、GOS ならびにラフィノースは酵素-HPLC 法による改良変法によってそれぞれ 97.2%、98.5%ならびに 98.2%が未水解オリゴ糖として定量された。これらの結果は AOAC 2009.01 法の定量結果と比較して顕著な差異は観察されなかった。

(2) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖の定量結果の再現性

FOS の構成成分の一つである GF₂ (1-ケストース) を 1 日に 1 度、5 日間繰り返して計 5 回、酵素-HPLC 法による改良変法を用いて定量し、定量結果の再現性 (精度) を評価した結果を Table 10 示す。定量法のばらつきの程度を示す標準偏差から理想値(100 g あたり 100 g が定量)の信頼区間は、下限が 95.0%、上限が 98.7%であった。また、酵素-HPLC 法による改良変法によって定量された 100 g あたりの GF₂ の定量値と水解されずに定量される理想値を比較し、1 サンプルの *t* 検定によって統計解析した結果、有意差は観察されなかった。すなわち、酵素-HPLC 法による改良変法によ

る定量結果は再現性が高いことが示された。

(3) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いたオリゴ糖含有モデル食品のオリゴ糖の定量

Table 11 は、AMG をブタ小腸粘膜 BBMV に代替した酵素-HPLC 法による改良変法ならびに AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖を添加したオリゴ糖含有モデル食品を定量した結果を示している。

AMG をブタ小腸粘膜 BBMV に代替した酵素-HPLC 法による改良変法を用いてクッキーに難消化性オリゴ糖または消化性オリゴ糖を添加して調製した難消化性オリゴ糖含有モデル食品中の未水解画分を定量した結果、FOS、GOS およびラフィノース添加クッキーは、それぞれ添加したオリゴ糖と同程度定量された。また、消化性の IMO およびスクロース添加クッキーは、未水解画分としてほとんど定量されなかった。

一方、AOAC 2009.01 法を用いてオリゴ糖を添加したオリゴ糖含有モデル食品中の未水解画分を定量した結果、FOS、GOS およびラフィノース添加クッキーは、それぞれ未水解画分として添加したオリゴ糖量より多く定量された。また、消化性の IMO 含有クッキーは添加した半分程度が未水解画分が定量され、スクロース含有クッキーは、未水解画分として添加した量よりも多く定量された。

(4) AOAC 2009.01 法を基にした改良変法を用いた特定保健用食品ならびに健康食品のオリゴ糖の定量

Table 12 は、AMG をブタ小腸粘膜 BBMV に代替した酵素-HPLC 法による改良変法を用いて特定保健用食品ならびにいわゆる健康食品中の難消化性オリゴ糖を定量した結果の平均値ならびに標準偏差を示している。また、各加工食品を 1 日に 1 度、5 日間繰り返して計 5 回、酵素-HPLC 法による改良変法を用いて定量し、定量結果の再現性（精度）を評価した結果を Table 13 に示す。

FOS 40%含有シロップを酵素-HPLC 法の改良変法によって定量した場合、定量法のばらつきを示す標準偏差の信頼区間は、下限が 38.7 g、上限が 43.6 g であった。FOS 40%含有シロップを 1 サンプルの t 検定によって統計解析した結果、有意差は観察されなかった。

GOS 44.4%含有シロップを改良変法によって定量した場合の標準偏差の信頼区間は、下限が 33.8 g、上限が 40.6 g であった。GOS 44.4%含有シロップを 1 サンプルの t 検定によって統計解析した結果、有意差が観察された。

GOS 17.0%含有黒酢を改良変法によって定量した結果、標準偏差の信頼区間は、下限が 8.6 g、上限が 12.2 g であった。GOS 17.0%含有黒酢を 1 サンプルの t 検定によって統計解析した結果、有意差が観察された。

GOS 2.5%含有炭酸飲料を改良変法によって定量した場合、標準偏差の信頼区間は、下限が 1.6 g、上限が 5.8 g であった。GOS 2.5%含有炭酸飲料を 1 サンプルの t 検定によって統計解析した結果、有意差が観察された。

ラフィノース 9.4%含有シロップを改良変法によって定量した場合の標準偏差の信頼区間は、

下限が 8.9 g、上限が 10.3 g であった。ラフィノース 9.4%含有シロップを 1 サンプルの t 検定によって統計解析した結果、有意差は観察されなかった。

一方、IMO 63.0%以上が含まれるシロップを改良変法によって定量した結果、標準偏差の信頼区間は、下限が 0.5 g、上限が 5.9 g であった。IMO 63.0%以上が含まれるシロップを 1 サンプルの t 検定によって統計解析した結果、有意差が観察された。

また、IMO 19.0%含有乳酸菌飲料は、酵素-HPLC 法による改良変法によって HPLC ではピークが検出されず、IMO は難消化性オリゴ糖として定量されなかった。IMO 19.0%含有乳酸菌飲料を 1 サンプルの t 検定によって統計解析した結果、有意差が観察された。

以上の結果、いずれも得られた定量結果の再現性は高いことが示された。しかしながら、食品の容器包装に記載されているオリゴ糖と必ずしも同程度にはならなかった。

IV. 考察

申請者は、難消化性オリゴ糖の代謝や機能性を研究する過程で、従来の食物繊維ならびに難消化性オリゴ糖定量の公定法である AOAC 2001.03 法では難消化性オリゴ糖を正確に定量できないのではないかと考え、まず始めにその問題点を明らかにした。さらに、AOAC 2001.03 法の酵素処理過程にブタ小腸粘膜酵素で水解する工程を加えた改良法を考案した。次に、本研究では、2010 年に公表された AOAC 2009.01 法における難消化性オリゴ糖定量法である酵素-HPLC 法においては、消化性糖質と難消化性オリゴ糖を区別して定量できないために、正確さに欠けるという欠陥を明らかにした。また、AOAC 2009.01 法は、低分子糖質水解酵素として採用している AMG が、オリゴ糖に対する特有の基質特異性をもつため、ヒト小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖が水解されないことを検証した。

さらに、このオリゴ糖定量法の問題点を解決するために、AOAC 2009.01 法で使用されている AMG に替わる水解酵素としてブタ小腸粘膜水解酵素を用いた AOAC 2009.01 法を基にした難消化性オリゴ糖の改良変法を開発した。そして、食品に含まれる難消化性オリゴ糖をより正確に定量できることを提示した。

FOS や GOS と同様に特定保健用食品の関与成分として IMO は認可されているが、他の難消化性オリゴ糖摂取時と比較し、呼気水素ガス排出がほとんど観察されない⁵⁷⁾。また、高浸透圧性下痢の最大無作用量が顕著に高いことが報告されている⁵⁸⁾。IMO 混餌飼料を成長期のラットに 6 週間摂取させた場合、FOS ならびにラクチュロース混餌飼料摂取とは異なり、対照群と同様に盲腸内の短鎖脂肪酸産生量は低く、Ca 吸収率も上昇しないことを申請者らは報告している⁴⁶⁾。これらのことから、IMO の生理機能が低いことは、小腸で大部分が消化・吸収されることが要因であると推察される。

しかしながら IMO を AOAC 2001.03 法で定量すると、上記したような *in vivo* の実験結果とは矛盾し、未水解物としてあたかも難消化性オリゴ糖として定量されることが常広らによって報告されている⁵⁹⁾。また、申請者も本研究において AOAC 2001.03 法を用いて IMO を定量した結果、その約 70% が水解されずに難消化性オリゴ糖として定量されることを確認した。さらに、AOAC 2001.03 法では、ヒト小腸粘膜酵素によって消化されるスクロースならびにラクトースも大部分が水解されずに難消化性オリゴ糖として定量されることについても明らかにした。これらの結果は、AOAC 2001.03 法に用いられている水解酵素では、ヒト小腸粘膜酵素で消化される糖質が水解されないために、これらを難消化性オリゴ糖として誤って定量されることを示している。すなわち、AOAC 2001.03 法では、食品に含まれる難消化性オリゴ糖を正確に評価できないことを本研究によって実証した。CODEX ならびに EU は、難消化性オリゴ糖の DP を 3 以上としているため、スクロースならびにラクトースが水解されずに定量されたとしても、それらは定義の範疇に入らないために問題とみなさないかもしれない。しかしながら、難消化性オリゴ糖定量の公定法では、それらが水解されずに難消化性として HPLC に検出されることは、測定原理に矛盾するものである。

申請者は、AOAC 2001.03 法の問題点は糖質水解酵素にあると考え、その解決策として AMG の酵素処理過程に加え、さらに、ブタ小腸粘膜酵素を用いて水解処理する定量法を考案した。ブタは

ヒトと類似した雑食の哺乳類で、水解酵素が含まれる小腸組織を安価で比較的容易に入手できることに着目した。そして、AOAC 2001.03 法の酵素処理過程にブタ小腸粘膜酵素で処理する工程を加えることによって難消化性オリゴ糖は加水分解されずに正確に測定できることを証明した。また、申請者が提案した AOAC 2001.03 法の改良法で定量すると、ヒト小腸粘膜酵素によって消化される IMO、スクロースならびにラクトースは、未水解画分としてほとんど定量されないことを提示した。この AOAC 2001.03 法の改良法の最大の特徴は、ヒト小腸粘膜酵素で消化される糖質を単糖まで水解し、消化されない糖質と区別して定量できることにある。そのため、申請者が考案した AOAC 2001.03 法の改良変法と酵素-重量法を組み合わせることによって食物繊維の定義に則った「ヒトの消化酵素で消化されない炭水化物の重合体」を正確に定量できる方法が確立できる可能性が示された。しかしながら、AOAC 2001.03 法では Prosky 法と同様に RS を一部しか測定できない問題点は課題として残されている (Fig. 19)。

一方、2009 年に CCNFSDU は、食物繊維の新たな定義を発表した⁷⁴⁾。これに伴い、2010 年に AOAC ならびに AACC が中心となって提唱した AOAC 2009.01 法 (酵素-重量-HPLC 法) が新たな食物繊維定量法として公表された⁷⁷⁾。この定量法は、食物繊維ならびに難消化性オリゴ糖定量のための AOAC 2001.03 法と RS 定量法 (AOAC 2002.02 法) を統合させたものである。AOAC 2009.01 法では耐熱性 α -アミラーゼを水解活性が低いブタ膵臓由来の α -アミラーゼに代替し、AOAC 2001.03 法では反応 pH が異なるために水解酵素ごとに反応させていた AMG とブタ膵臓由来の α -アミラーゼで同時に 16 時間、37°C で酵素処理することとなった。その後の分画操作は、従来の AOAC 2001.03 法の操作と同様にプロテアーゼによるタンパク質分解後、エタノール沈殿し、高分子画分が含まれる残渣を食物繊維あるいは RS として重量を測定する。また、エタノールで沈殿しなかった上清に含まれる難消化性オリゴ糖などは HPLC で分析・定量する。難消化性オリゴ糖を含む食物繊維素材は多種多様であるために、これまで AOAC 2001.03 法ならびに RS の個別定量法を組み合わせるとして定量せざるを得なかったが、この定量法の開発によってそれらの煩雑さが軽減された (Fig. 20)。しかしながら、短所として AOAC 2009.01 法は、ブタ膵臓由来 α -アミラーゼを酵素処理に用いるため、これまでの AOAC 2001.03 法と比較して 1 試料の分析に要する時間が長くなる欠点を有している。この他にも AOAC 2009.01 法には、サンプルを糊化させずに定量操作を実施すること、高タンパク質・高脂質の試料に対する定量の精度が低下すること、ならびに消化性オリゴ糖を加水分解できずに難消化性オリゴ糖として誤って定量する可能性があることが考えられる。

申請者は、AOAC 2001.03 法では、ヒト小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖を水解できないために、これらのオリゴ糖が難消化性オリゴ糖として定量されるという欠陥があることを実証した。その要因は AOAC 2001.03 法に低分子糖質水解酵素として採用されている AMG にある可能性を示した。一方、AOAC 2009.01 法は AOAC 2001.03 法と同じ *Aspergillus niger* 由来 AMG を採用しているため、難消化性オリゴ糖が正確に定量できない欠陥を有している可能性が高い。そのため、本研究では、さらに AOAC 2009.01 法における難消化性オリゴ糖定量法の問題点ならびにその要因を検討した。

小腸粘膜酵素によって消化されることが既に検証されているスクロース、パラチノース、カップリングシュガー[®]、マルトトリオース、パノースならびに IMO を試料として AOAC 2009.01 法を用

いてオリゴ糖を定量した結果、マルトトリオース以外は水解されずに難消化性オリゴ糖として定量された。この結果は、予測していたように、申請者が AOAC 2001.03 法を用いて測定した結果と同一であった。2 種類の食物繊維測定キット指定の水解酵素を用いた定量結果に顕著な差異が観察されなかったのは、いずれのキットにも低分子糖質水解酵素として *Aspergillus niger* 由来の AMG を用いていることが共通点として挙げられる。

AMG は微生物由来の水解酵素で、多くの真菌が保有していることが既に明らかにされている⁹⁸⁾。しかし、AMG は高等植物や動物から見出されていない⁹⁹⁾。この酵素は、工業的に高頻度に利用されている酵素の一つで、デンプンやマルトオリゴ糖などの非還元末端からエキソ型で α -1,4 結合に作用し、 β -グルコースを生成する。また、この酵素の反応速度は遅いが α -1,3 ならびに α -1,6 グルコシド結合にも作用することができる¹⁰⁰⁾。したがって、理論的には、 α -アミラーゼと併用することによりデンプンを完全に水解することが可能とされている。しかしながら、AMG はスクロースをほとんど水解できなかつたことから α -1,2 結合に対する水解能はきわめて低い可能性がある。AOAC 2009.01 法に用いられている *Aspergillus niger* 由来 AMG のスクロースに対する水解速度は、マルトースのその 1/100 程度で、基質に対する親和性が低いことが既に報告されている⁹⁸⁾。AOAC 2009.01 法に用いられている水解酵素はマルトトリオース 95%以上を水解したにもかかわらず、スクロースを 1%程度しか水解できなかつたことは、AMG の基質特異性によるものと考えられる。

カップリングシュガー[®]は、AOAC 2009.01 法によって部分的に水解され、1/3 程度が難消化性オリゴ糖として定量された。カップリングシュガー[®]はスクロースのグルコース残基にグルコース 1-5 分子が α -1,4 結合した混合物である¹⁰¹⁾。したがって、カップリングシュガー[®]が一部しか水解されなかつた原因は、スクロースに付加していたグルコースのグルコシド結合のみを AMG が選択的に水解したことが考えられる。

また、AOAC 2009.01 法に用いられている水解酵素では、ヒトの消化酵素で容易に消化されるパノースならびに IMO も部分的にしか水解できなかつた。パノースはマルトースの非還元末端グルコース残基にグルコースが α -1,6 結合した三糖で¹⁰²⁾、IMO はグルコースの α -1,6 結合を基本とし、これにグルコースが α -1,6 または α -1,4 結合している二糖、三糖ならびに四糖を含む混合糖質である¹⁰³⁾。*Aspergillus niger* 由来 AMG のイソマルトースに対する水解速度はマルトースと比較して 1/10 以下であることが既に報告されている⁹⁸⁾。そのため、パノースおよび IMO が AMG によって水解されずに難消化性オリゴ糖として定量された結果は、AOAC 2009.01 法指定の AMG による基質特異性の影響だけでなく、酵素添加量の不足も要因の一つであることを示している。AOAC 2009.01 法において、水解酵素である AMG の添加量 (unit) の検討は、高分子消化性多糖であるトウモロコシデンプンの消化率を基準に決定されている¹⁰⁴⁾。また、これまで消化性オリゴ糖を用いて AOAC 2009.01 法の AMG の酵素添加量を検討した研究報告は皆無である。Prosky 法が確立してから 20 年以上経ち、酵素-重量法は食物繊維の定義の変遷に従って改定されてきたが、AMG を酵素-重量法の低分子糖質水解酵素として採用され続けることについて問題視する報告はない。しかしながら、本研究で得られた結果が示すように、AMG はヒト消化酵素で消化される低分子消化性糖質を完全に水解することはきわめて難しい。したがって、AMG を難消化性オリゴ糖定量に用いることは不適切であると考えられる。

一方、ネガティブコントロールとして用いた FOS は、AOAC 2009.01 法を用いて定量すると、その 1%程度しか水解されずに定量された。また、GOS ならびにラフィノースは、AOAC 2009.01 法で定量しても FOS と同様に水解されずに難消化性オリゴ糖として定量された。これらの結果は、既に *in vitro* および *in vivo* の実験により検証されている FOS、GOS ならびにラフィノースの消化性と一致している^{87-89,105-107}。すなわち、AOAC 2009.01 法はヒト消化酵素で消化されない FOS、GOS、ラフィノースなどのオリゴ糖が定量には問題のないことを示している。

以上の結果、AOAC 2009.01 法を用いて難消化性オリゴ糖を定量する場合、消化性糖質を難消化性オリゴ糖として定量する欠陥があることが明らかとなった。

申請者は、AOAC 2009.01 法のオリゴ糖定量の問題点が、AMG のオリゴ糖水解能によるものと推測し、この問題点を明らかにするため、2つの仮説を立てて検証を行った。1つ目の問題点は、AOAC 2009.01 法に採用されている AMG がヒトの小腸粘膜酵素に比べて強い基質特異性を持っているため、AMG ではヒト消化酵素で消化されるオリゴ糖を容易に水解できない可能性である。2つ目は、AOAC 2009.01 法に使用されている AMG の添加量に問題があり、公定法に指示されている α -グルコシダーゼ添加量 (unit) は消化性オリゴ糖を完全に水解するには不十分な可能性がある。

まず一つ目の問題点を明らかにするため、数種類のオリゴ糖を試料として AMG またはヒト小腸粘膜ホモジネートを用いて *in vitro* の水解実験を行った。両酵素間で未水解物の残存率に顕著な差異が観察されたのは、スクロース、パラチノースならびにトレハロースであった。AMG による酵素処理後、スクロースは約 80%、パラチノースならびにトレハロースは約 100%が未水解画分として回収された。この結果は、AOAC 2009.01 法を用いてスクロースならびにパラチノースを定量した結果と類似していた。スクロース、パラチノースならびにトレハロースの共通点は、ヒトの消化酵素で消化され、構成糖がグルコースならびにフラクトースであることである。そのため、AMG は 2 種類以上の構成糖から成る糖質に対して水解能が低いことが考えられる。

AMG は酵素の分類上では glucan-1,4- α -glucosidase (Enzyme Commission number 3.2.1.3) である¹⁰⁸。一方、ヒト小腸粘膜二糖類水解酵素は、 α -glucosidase (Enzyme Commission number 3.2.1.20)¹⁰⁹ ならびに sucrose α -glucosidase (Enzyme Commission number 3.2.1.48) の 2 種類の α -グルコシダーゼをもつ¹¹⁰。AMG は酵素分類上からもヒト小腸二糖類水解酵素とは異なり、デンプンの分解能に比べてスクロースに対する水解能は低い⁹⁸。したがって、AMG は難消化性オリゴ糖定量法の水解酵素として用いるには、特有の基質特異性をもつため不適切であると考えられる。

次に、AOAC 2009.01 法指定の AMG 添加量では、消化性オリゴ糖を水解するためには不十分であることを明らかにした。ブタ膵臓 α -アミラーゼの酵素添加量 (unit) は一定にして、AMG 酵素量を AOAC 2009.01 法の指定量、2 倍量、4 倍量ならびに 10 倍量にした酵素混合溶液を調製し、IMO ならびにスクロースの未水解画分の残存率を評価した。その結果、酵素添加量を 10 倍に増加しても IMO ならびにスクロースのいずれも大部分が水解されずに未水解画分として残存していた。AMG は IMO を構成する 6 種類のオリゴ糖をすべて水解することが既に明らかにされている^{98,111}。そのため、AMG 酵素添加量が十分であるならば、IMO は全て水解されるはずである。事実、先の *in vitro* 水解実験においてヒト小腸粘膜ホモジネートと AMG の間に IMO の水解能に顕著な差異がないことを明らかにしている。したがって、AMG は IMO を水解することができるので、AOAC

2009.01 法の α -グルコシダーゼの酵素添加量(AMG 添加量)が不十分であることを裏付けている。

一方、スクロースは AMG 添加量を 10 倍に増加しても、5%程度しか水解されずに未水解画分として回収された。スクロースが AMG の酵素処理によってわずかしか水解されずに定量された要因は、酵素添加量が不足していることが一因であると考えられた。しかしながら、酵素添加量を増加してもその未水解物の残存率に変化を及ぼさなかったことから、スクロースが水解されなかったのは、AMG のオリゴ糖に対する特有の基質特異性による影響が強いと考える。

以上の結果、AMG を用いた AOAC 2009.01 法は、AMG による糖質の水解がヒト小腸粘膜酵素と比較して特有の基質特異性を持っていること、ならびに AOAC 2009.01 法で採用されている AMG 添加量の不足が原因となり、消化性オリゴ糖が水解されないオリゴ糖として定量されることが明らかになった。AMG 添加量不足の問題は、コストの問題を考慮しなければ、解決できる問題かもしれない。しかしながら、AMG がヒト小腸粘膜二糖類水解酵素で消化されるオリゴ糖をきわめて水解しにくいことは、オリゴ糖定量に用いる水解酵素として致命的な欠陥であると考えられる。これまで得られた結果から、AOAC 2009.01 法は、消化性オリゴ糖を難消化性オリゴ糖と区別して正確に定量することはきわめて難しいことが明らかになった。食物繊維の定義の変化に伴って AOAC 985.29 から AOAC 2009.01 法に至る約 25 年間で様々な定量法が開発され、AOAC 公定法として認可されてきた⁵¹⁾。また、定義の範疇に含まれる成分を正確に定量するために公定法は改良を重ねてきている⁵¹⁾。申請者は AOAC 2009.01 法では難消化性オリゴ糖を正確に定量できないという問題を解決するため、AMG の代替水解酵素を探索し、難消化性オリゴ糖を正確に測定できる定量法の開発を試みた。

ブタ小腸粘膜酵素は昔からヒトのその代用品として使用されている。それゆえ、二糖類水解酵素の活性はヒトのそれとよく類似している可能性が高い。事実、NCBI のデータベース上においてヒト小腸粘膜二糖類水解酵素とブタのそれらの遺伝子の相同性はスクラーゼ・イソマルターゼ複合体が 74%、マルターゼが 91%およびラクターゼは 55%であることが確認されている。また、ブタ二糖類水解酵素はスクラーゼ・イソマルターゼ複合体の分子量は 260,000¹¹²⁾、グルコアミラーゼ (マルターゼ) は 210,000¹¹³⁾、ラクターゼ・フロリジン水解酵素は 160,000¹¹⁴⁾でおおよそ 200,000 弱から 250,000 強の分子量である。一方、ヒトのスクラーゼ・イソマルターゼ複合体の分子量は 230,000¹¹⁵⁾、マルターゼ/グルコアミラーゼ (マルターゼ) は 335,000¹¹⁶⁾、ラクターゼ・フロリジン水解酵素は 160,000¹¹⁴⁾で、マルターゼ/グルコアミラーゼは分子量がブタに比べて分子量が大きい、消化管粘膜上に消化酵素が局在していることや消化酵素が複合体を形成しているなど類似点が多い特徴をもっている。

ブタならびにヒト小腸粘膜酵素を用いて難消化性オリゴ糖を酵素処理した結果、FOS、RMD ならびに GS の消化性に顕著な差異は観察されなかった。また、 β -ガラクトシド結合を持つラクチュロース、GOS およびセロビオースの水解性もヒトと比較して同程度であった。すなわち、ブタ小腸粘膜酵素はヒトのそれと同様に難消化性オリゴ糖をきわめて水解しにくいことが明らかになった。

次に、ヒトならびにブタ小腸粘膜の各二糖類水解酵素比活性が類似しているかについて比較・検討した。スクラーゼの比活性を基準にブタならびにヒトの二糖類水解酵素の比活性の相対比を比較したところ、ブタは、ラクターゼ比活性がヒトに比べてわずかに高かった。また、マルターゼの比

活性がヒトに比べて低かったが、その他のトレハラーゼ、パラチナーゼならびにイソマルターゼに関しては同程度であった。申請者らはラットならびにヒト小腸二糖類水解酵素活性に顕著な差異がないことを *in vitro* 実験で明らかにしている⁹⁵⁾。過去に報告したヒトならびにラット小腸粘膜二糖類水解酵素の相対比と本研究で得られたヒトおよびブタ小腸粘膜二糖類水解酵素の相対比を比較すると、その結果は類似していた。ブタならびにヒト小腸粘膜酵素は比較的相同性が高く、二糖類水解酵素活性ならびに難消化性糖質に対する消化性も同等であった。

微生物由来の水解酵素は安価で入手が容易かつ酵素比活性が高い特徴を持っている。IMO は市販の微生物由来のマルターゼ (α -グルコシダーゼ) によって完全に水解された。一方、FOS も IMO と同様に微生物由来のマルターゼでほぼ完全に水解された。FOS は大腸常在菌である *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* によって資化されることが既に明らかにされている¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾。本研究で用いた *Aspergillus niger* 由来の水解酵素で水解されることは報告されていないが、微生物由来の水解酵素はヒトの消化酵素と比較して基質特異性が低いため、FOS を水解した可能性がある。

また、市販の微生物由来の β -ガラクトシダーゼによってラクチュロースは 65%が水解された。一方、*Cryptococcus laurentii* 由来の β -ガラクトシダーゼはヒトで消化されないラクチュロース、セロビオースならびにラクチトールを基質とすることが報告されている¹²⁰⁾。さらに、*Thermomyces lanuginosus* はラクチュロースを水解し、その *K_m* は 5 mM であることが報告されている¹²¹⁾。以上のことから、本研究で用いた微生物由来の低分子糖質水解酵素は、ヒトやラットなど哺乳類由来の小腸粘膜二糖類水解酵素に比べて、基質特異性が低く、難消化性オリゴ糖を容易に水解する。そのため、微生物由来の水解酵素は、難消化性オリゴ糖定量法に用いるには不適切であると考えられる。

以上の結果、ブタ小腸粘膜二糖類水解酵素は、微生物由来の水解酵素と比べるとヒトに類似しており、AMG の代替酵素としてブタ小腸粘膜二糖類水解酵素を採用してオリゴ糖定量法を検討することが妥当であると結論付けられた。

最後に、AOAC 2009.01 法の AMG をブタ小腸粘膜酵素で代替したオリゴ糖定量の改良変法の妥当性について論ずる。簡便かつ正確な難消化性オリゴ糖定量法の確立を目的とした場合、新たな設備投資が少なく、普及先の研究機関等で分析可能な方法であるかどうかは重要な問題である。そのため、本研究では AOAC 2009.01 法の糖質水解酵素である AMG のみを代替して難消化性オリゴ糖定量における問題を解決すると共に、難消化性オリゴ糖を正確に定量できる AOAC 2009.01 法を基にした改良変法 (酵素-HPLC 法による改良変法) の確立を試みた。酵素-HPLC 法による改良変法では、低分子消化性糖質を水解できない AMG を代替すること、ならびに酵素添加量を検討し、より正確な難消化性オリゴ糖定量法を開発することを目的とした。そのため、まず糖質の酵素処理条件を検討した。ブタ小腸粘膜スクラーゼの最適 pH ならびに最適温度は、pH 6.6 および 37°C であることが報告されている¹²²⁾。また、ブタ小腸のマルターゼに関しても最適 pH が 6.0 であることが報告されている¹¹³⁾。それゆえ、酵素-HPLC 法による改良変法では、AOAC 2009.01 法の糖質酵素処理条件の pH 6.0、37°C ならびに 16 時間の反応条件をそのまま採用することにした。この酵素処理条件は、AOAC 2009.01 法に用いられているブタ膵臓由来の α -アミラーゼに対しても水解能に与える影響も最小限にすることができる。

次に、反応系に添加するブタ小腸粘膜 BBMV の酵素量の検討を行った。本研究で提案する酵素

—HPLC 法による改良変法は、「ヒトの消化酵素で消化されない炭水化物の重合体」を定量できる定量法でなければならない。すなわち、ヒト小腸粘膜酵素で消化される糖質は全て消化されるよう酵素添加量を検討する必要がある。本研究では、特に低分子のオリゴ糖に着目しているため、加工食品への使用頻度が高いスクロース、難消化性オリゴ糖として公的に取り扱われている IMO、そして消化性多糖で食物繊維定量法の酵素添加量の指標に使用されている可溶性デンプンを用いて酵素添加量の至適条件を検討した。

IMO は、特定保健用食品の関与成分として一般的には難消化性オリゴ糖として取り扱われているが、ヒトへ摂取させた場合、腸内細菌による発酵の指標である呼気水素ガスが排出されない⁵⁷⁾ことから IMO は消化性オリゴ糖である。また、本研究のヒトならびにブタ小腸ホモジネートを用いた水解実験の結果からも IMO は水解されることが実証されている。マルトトリオースまたはマルトースを指標にして酵素—HPLC 法による改良変法の α -グルコシダーゼ添加量を検討すると、酵素添加量の不足が生じて従来の AOAC 2009.01 法と同様に IMO が水解されずに定量される可能性がある。そのため、本研究では、IMO を用いて酵素添加量の検討を行うことにした。AOAC 2009.01 法における酵素添加指定量では、消化性糖質を単糖まで水解できないことを考慮し、AOAC 2009.01 法指定の α -グルコシダーゼ量 (unit) およびその 1,200 倍まで酵素添加量を増加し、各消化性糖質の未水解画分の残存率を検討した。

酵素—HPLC 法による改良変法ではスクロース、IMO および可溶性デンプンのいずれの消化性糖質も酵素添加量に依存してそれらの未水解画分の残存率は減少した。スクロースは、ブタ小腸粘膜 BBMV 添加量を 680 unit/mL (AOAC 2009.01 法指定の約 200 倍量) 添加することによりほとんど水解された。IMO はブタ小腸粘膜 BBMV 添加量を 2,720 unit/mL (約 800 倍量) 添加することによりそのほとんどが構成糖のグルコースまで水解された。一方、可溶性デンプンはブタ小腸粘膜 BBMV 添加量を 1,965 unit/mL (約 600 倍) 以上添加しても可溶性デンプンの残存率には変化はなく、約 10% 水解されずに定量された。可溶性デンプンの一部がなぜ水解されずに残存したかについては不明であるが、未水解画分の残存率がその 2 倍量 (4,080 units/mL) の酵素を添加しても減少しなかったことから酵素量が不足していたとは考えにくい。長時間の酵素処理により可溶性デンプン内の構造が変化し、水解しにくい構造に変化した可能性が考えられる。AOAC 2001.03 法の酵素処理過程にブタ小腸粘膜酵素を加えた改良法では、可溶性デンプンの一部が水解されずに残存することは観察されていない。AOAC 2001.03 改良法と酵素—HPLC 法による改良変法の違いは、酵素処理時間ならびに AMG を用いているか否かである。可溶性デンプンが一部水解されずに残存したことについては今後更なる検討が必要であると考えられる。

以上の結果より、酵素—HPLC 法による改良変法に用いるブタ小腸粘膜 BBMV を添加する α -グルコシダーゼ unit 量は、IMO をほとんど水解できる最小量の 2,720 unit/mL が妥当な添加量とし、この酵素添加量を採用することにした。

AMG をブタ小腸粘膜 BBMV に代替した酵素—HPLC 法による改良変法では、AOAC 2009.01 法では水解できなかった消化性糖質を水解し、難消化性オリゴ糖として定量されることはなかった。これらの結果は、これまで報告されてきた各種消化性オリゴ糖の消化性を検討した *in vitro* ならびに *in vivo* 実験の研究報告と一致している^{57,87-96)}。AOAC 2009.01 法を用いた場合と同様に、酵素—

HPLC 法による改良変法は、ヒト小腸粘膜酵素できわめて消化しにくい FOS、GOS ならびにラフィノースを水解せずに難消化性オリゴ糖として定量した。酵素-HPLC 法による改良変法では、本研究で用いたオリゴ糖と同様なグルコシド結合を有するキシロオリゴ糖、ラクチュロースならびに GS などについても水解せずに難消化性オリゴ糖として正確に定量できるものとする。

酵素-HPLC 法による改良変法は、ヒト小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖を水解し、難消化性オリゴ糖と消化性糖質を区別して正確に定量できることを明らかにした。次に、酵素-HPLC 法による改良変法を用いて加工食品中の難消化性オリゴ糖を正確に定量できるか否かを検討した。

最初に、難消化性オリゴ糖を含有していない市販クッキーにオリゴ糖を加えて調製したオリゴ糖含有モデル食品の難消化性オリゴ糖の定量を試みた。調製したオリゴ糖含有モデル食品のクッキーを酵素-HPLC 法による改良変法によって定量した結果、IMO ならびにスクロースを混合させたクッキーは、クッキー内に含まれる小麦デンプンならびにスクロースなどと一緒にそれらも水解され、難消化性オリゴ糖として定量されなかった。一方、FOS、GOS ならびにラフィノースを添加したクッキーにおいては、添加した難消化性オリゴ糖以外の糖質は水解され、添加したオリゴ糖だけが未水解画分として定量された。AOAC 2009.01 法では、消化性ならびに難消化性オリゴ糖を混合させたいずれのクッキーにおいてもオリゴ糖添加量よりも得られた回収率の方が高かった。

西端らは、AMG を用いた AOAC 2001.03 法では市販食品に含まれる FOS ならびに RMD が食品の容器包装に記載された含有量よりも多く定量されることを報告している¹²³⁾。また、Brunt らは AOAC 2009.01 法を用いて小麦穀粒パンの食物繊維量を定量した場合、デンプンならびにマルトデキストリンがグルコースまで水解されないため、難消化性オリゴ糖画分の定量値が高くなることを報告している¹²⁴⁾。これらの結果は、本研究においてオリゴ糖含有クッキーを AOAC 2009.01 法によって定量した結果と一致している。つまり、AOAC 2009.01 法では消化性糖質が水解されないため、難消化性オリゴ糖として消化性糖質を定量し、食品に含まれる難消化性成分よりも多く定量することを示している。これに対して、本研究で提案する酵素-HPLC 法による改良変法は、AOAC 2009.01 法と比較して添加した難消化性オリゴ糖のみを正確に定量できたことから定量法として妥当性が高いといえる。

特定保健用食品ならびに、いわゆる健康食品として市販されている加工食品中の難消化性オリゴ糖を酵素-HPLC 法による改良変法を用いて定量した結果、FOS およびラフィノースが含まれる加工食品においても食品の容器包装に記載されたオリゴ糖含有量と同程度が定量された。GOS 含有試料においては、食品の容器包装に記載されたオリゴ糖含有量よりも多く定量される食品と少なくとも定量される食品があった。現在、栄養表示基準における食物繊維の実測値が表示値の許容誤差範囲は $\pm 20\%$ であることが取り決められている¹²⁵⁾。本実験で定量に用いた GOS 含有試料のうち、シロップの実測値は許容誤差範囲内であったが、黒酢は許容範囲内より少なく、炭酸飲料については多く定量された。GOS 標品ならびに GOS 標品を添加したクッキーにおいては、改良変法によって正確に定量できた。GOS 含有食品においてのみ実測値が表示値の許容誤差範囲外になる理由の一つは、ブタ小腸粘膜二糖類水解酵素は、ヒトのそれらに比べてラクターゼ活性が強いことが影響している可能性がある。本研究で用いた GOS 標品やモデル食品に添加した GOS に関しては、構造ならびに純度などについての詳細な情報があるが、加工食品に使用されている GOS については詳細な情報が

ない。それゆえ、生産方法が異なれば構造ならびに純度も異なることが推測され、ブタ小腸粘膜酵素で GOS の一部を水解している可能性など考えられる。酵素-HPLC 法による改良変法を用いた GOS 含有加工食品の定量については今後、更なる検討が必要である。

一方、IMO を含有した特定保健用食品においては、酵素-HPLC 法による改良変法を用いることにより、IMO 単独ならびに IMO 含有クッキーと同様に加工食品中に含まれる IMO は水解され、難消化性オリゴ糖として定量されなかった。難消化性オリゴ糖の定量は、わが国では、公的あるいは準公的な定量法として個別定量法が採用されている。IMO についてもそれは例外ではなく、加工食品中に含まれる IMO を水抽出し、構成成分を直接 HPLC で分別して定量している⁶⁵⁾。そのため、本研究で用いた消化性オリゴ糖を単糖まで水解し、水解されなかった糖質を難消化性オリゴ糖とする間接的な定量法とは原理が異なる。この違いが、加工食品に表示されている含量と酵素-HPLC 法による改良変法における定量結果の差異に関係している。

難消化性オリゴ糖の生理作用の発現は、消化されずに大腸に到達する量に依存する^{46,126)}。食品に含まれる分量は、その食品の摂取により期待する生理機能を保証できる量を食品へ添加する必要がある。ヒトが難消化性オリゴ糖含有加工食品の摂取によって整腸作用などの健康効果を得るためには、栄養表示基準制度において一日摂取目安量が 10 g 以下とされている。しかし、IMO 含有食品を例に挙げると、この目安量では期待した健康効果が得られないことが推察される。その理由として AOAC 2009.01 法ならびに AOAC 2001.03 法では、機能成分である IMO 含有量が高く評価されている可能性があるからである。一方、本研究で提案した酵素-HPLC 法による改良変法は、消化されずに大腸へ到達し、機能を発現する糖質量の推測が可能である。それゆえ、消費者が難消化性オリゴ糖含有加工食品に期待する生理機能を保証し、食品の選択性の拡大に繋がると考えている。

本研究で提案する酵素-HPLC 法による改良変法は AMG の代わりにブタ小腸粘膜 BBMV を加えて酵素溶液を調製しており、それを混合すると酵素溶液は白濁する。その理由としてブタ小腸粘膜 BBMV は部分精製した酵素であること、ならびに酵素-HPLC 法による改良変法では AOAC 2009.01 法と比較して α -グルコシダーゼとして 800 倍量の酵素 unit を添加していることが原因である。AOAC 2009.01 法においては各研究機関間における定量結果の再現性の検討が報告され、その定量結果の再現性が認められている¹²⁷⁾。一方、酵素-HPLC 法による改良変法は AOAC 2009.01 法の反応条件に基づき考案した定量法ではあるが、ブタ小腸粘膜 BBMV を用いることにより定量操作が煩雑になる。したがって、定量結果の再現性に悪影響を与えている可能性が考えられる。

そこで、FOS の構成成分の一つである GF₂ を試料にし、酵素-HPLC 法による改良変法の定量結果の再現性について相対標準偏差を指標にして評価した。GF₂ は酵素-HPLC 法による改良変法によって平均 98.2%が定量され、定量結果の再現性の指標である相対標準偏差は 1.5%であった。近年、報告された AOAC 2009.01 法のオリゴ糖画分における定量結果の相対標準偏差は、0.28-1.03%で再現性が高いことが報告されている¹²⁷⁾。本研究で提案する酵素-HPLC 法による改良変法は AOAC 2009.01 法と比較しても、その相対標準偏差は同程度であったことから定量結果の再現性が高いことが示された。また、加工食品などの様々な食品成分が混在する食品を用いた場合においても酵素-HPLC 法による改良変法を用いた定量結果の再現性は高かった。各難消化性オリゴ糖にはそれぞれ個別定量法があるが、酵素-HPLC 法による改良変法は、いかなる難消化性オリゴ糖が含

まれている加工食品においても適用できる可能性が示された。

しかしながら、酵素-HPLC法による改良変法を確立させるためには、下記の問題点を今後検討する必要がある。本研究から得られた結果より、申請者は難消化性および消化性糖質の消化性についてヒト小腸粘膜酵素と比較してブタ小腸粘膜酵素に顕著な差異はないと結論付けている。一方、Skovbjergらはブタのラクターゼがヒトの小腸粘膜酵素できわめて消化しにくいセロビオースを消化することを報告している¹⁴⁾。つまり、ヒトとブタの小腸粘膜酵素は類似しているが、基質に対する特異性については多少異なる。このブタ小腸粘膜酵素の基質特異性は、ブタの種や性別、さらには発育段階などの違いによっても変化する可能性が考えられる。そのため、酵素-HPLC法による改良変法を確立させる際には、これらの違いを厳密に評価・検討し、酵素源を選択する必要がある。また、今後、酵素-HPLC法による改良変法の水解酵素としてブタ小腸粘膜酵素を用いる際には、酵素源の安定供給ができるか否かについても検討していく必要がある。

難消化性オリゴ糖定量法として酵素-HPLC法による改良変法の妥当性ならびに再現性が高いことを本研究では提示した。しかし、酵素-HPLC法による改良変法に用いているブタ小腸粘膜BBMVは、二糖類水解酵素以外にもアルカリフォスファターゼならびにアミノペプチダーゼなど小腸粘膜酵素が多く含まれており、酵素活性が微生物由来の水解酵素と比較して低い。これまでにブタ小腸粘膜BBMVを8回、部分調製したが、その α -グルコシダーゼ unitの平均値は1.8 unit/mg proteinであった。同じ部位を用いて部分精製を実施しているが、得られる酵素活性にはばらつきがある。また、AMGの代わりに用いたブタ小腸粘膜BBMVは、部分精製酵素であるために白濁した酵素反応溶液になる。したがって、定量操作が煩雑になり、定量結果の再現性を低くする要因になる可能性がある。そのため、小腸粘膜BBMVを用いた酵素-HPLC法による改良変法では、施設間における定量法の妥当性検討を実施しても、その結果はばらつくことが予想される。この酵素-HPLC法による改良変法が国際的に広く受け入れるためには、現在用いているブタ小腸粘膜酵素中の不純物を除去して酵素活性ならびに汎用性が高い酵素標本を精製する必要がある。

食物繊維の定義の範疇の物質を定量する場合、「ヒトの消化酵素で消化されない」特性以外に着目して定量法を確立することは困難である。事実、本研究で提案する酵素-HPLC法による改良変法においても難消化性オリゴ糖の消化性を重視して開発した定量法である。食物繊維、単糖糖アルコールならびに希少糖などルミナコイド素材の包括的定量法を確立するとき、これまでの「ヒトの消化酵素で消化されない」ことに加え、「ヒトの消化管で吸収されにくい」および「消化管を介して健康の維持に役立つ生理作用を発現する」ことにも焦点をあてる必要がある。それゆえ、今後は、食物繊維ならびにルミナコイドを包括する定義の範囲が広がることに伴い、分別定量法を組み合わせることを考慮して定量法の確立、さらには発展を目標として研究に取り組む必要がある。

VI. 総括

本研究では難消化性オリゴ糖の代謝や機能性を研究する過程で、難消化性オリゴ糖として分類されている食品素材における矛盾を端緒にし、難消化性糖質定量の中でも、とくに難消化性オリゴ糖定量に焦点をあて、公定法である AOAC 2001.03 法ならびにその定量法を改新した AOAC 2009.01 法の酵素-HPLC 法（難消化性オリゴ糖定量法）における問題点を明らかにし、AOAC 2009.01 法の原理を基にして考案した難消化性オリゴ糖を包括した定量法の開発を試みた。

本実験結果より、AOAC 2001.03 法ならびに AOAC 2009.01 法は、ヒトの消化管を模した酵素処理過程であるとされているが、ヒト小腸粘膜酵素で消化できるオリゴ糖を水解できないことを明らかにした。そのため、難消化性オリゴ糖を正確に定量できるとは言い難い。しかしながら、AOAC 2009.01 法がわが国を含め国際的に食物繊維の新たな定量法として採用されることになれば、オリゴ糖画分の定量に限っては、食品中の難消化性オリゴ糖含有量を正確に測定できないために不正確な情報を消費者に与える恐れがある。すなわち、消費者が特定保健用食品をはじめとする健康志向食品から期待する生理機能を保証し難い状況になる。さらに、この定量法を用いて水解されなかった食物成分が難消化性オリゴ糖とされることになれば、栄養教育、栄養表示ならびにエネルギー評価の面においても大きな問題が生じることになる。AOAC 2009.01 法を用いた難消化性オリゴ糖画分の定量の欠陥については、Brunt らや Westenbrink らも報告している^{124,128)}。

一方、本研究で提案した酵素-HPLC 法による改良変法は、消化されずに大腸へ到達し、腸内細菌を介して機能を発現する糖質量を理論的には定量することができる。本研究で提案する酵素-HPLC 法による改良変法は、食物繊維の定義に則った「ヒトの消化酵素で消化されない炭水化物の重合体」を明確に区別できるため、オリゴ糖がもつ生理機能の有無の評価が可能になる。したがって、消費者が難消化性オリゴ糖含有加工食品に期待する生理機能を保証し、消費者の食品選択の拡大に繋がる。近年、プレバイオティクスやプロバイオティクスなど腸内細菌を介した健康との関わりに焦点をあてて取り組む研究が増えており、腸内フローラと肥満、生活習慣病対策やアレルギーなどに関する研究が盛んに行われている¹²⁹⁾。特に、プレバイオティクス効果をもつ難消化性オリゴ糖への関心はさらに高まり、それらの加工食品への使用頻度が今後高まることが予想される。また、オリゴ糖の持つ二次機能にも注目が集まっており、様々なオリゴ糖の加工食品への使用頻度が高まっている。それゆえ、生理機能を有するオリゴ糖か、味質に関連する第二次機能だけを有しているオリゴ糖であるか否かを区別して評価する必要性が今後高まってくるものが予想される。したがって、より正確なオリゴ糖定量法は、これらの研究の更なる発展に寄与できる可能性をもたらす。さらに、酵素-HPLC 法による改良変法の確立は、生産者においても加工食品へ添加量、その成分の機能性について再考する機会を与え、加工食品の設計に利用できる基礎資料の提供が期待される。酵素-HPLC 法による改良変法には、酵素の規格化など検討課題があるが、その需要はきわめて高く、食品産業の発展およびヒトの健康の保持増進に貢献するものと考えられる。

V. 要約

本研究では、難消化性糖質の公定法である AOAC 2001.03 法ならびにその定量法を改新した AOAC 2009.01 法では難消化性オリゴ糖を正確に定量できないことを実証し、その要因を明らかにした。さらに、その問題点を解決するため AOAC 2009.01 法を基にした難消化性オリゴ糖の改良変法を考案し、難消化性オリゴ糖を正確に測定できる定量法の確立を試みた。得られた結果は以下の通りである。

- 1) AOAC 2001.03 法では、ヒト小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖が水解されず、難消化性オリゴ糖として定量される問題点が明らかになった。
- 2) 微生物由来の水解酵素と比較し、ブタ小腸粘膜酵素はヒト小腸粘膜酵素で消化されない糖質は水解せず、消化される糖質のみを水解した。したがって、ブタ小腸由来の水解酵素は難消化性オリゴ糖定量法に使用する低分子糖質水解酵素に適していた。
- 3) AOAC 2001.03 法の酵素処理過程にブタ小腸粘膜酵素で水解する工程を加えた改良法は、消化性オリゴ糖を水解し、難消化性オリゴ糖と区別して定量できることが明らかになった。
- 4) AOAC 2009.01 法では、ヒト小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖が水解されず、難消化性オリゴ糖として定量される問題点が明らかになった。
- 5) AOAC 2009.01 法指定の AMG は、基質に対する特異性が強いために小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖であっても水解できないオリゴ糖が存在することが判明した。また、AOAC 2009.01 法指定の AMG 添加量では、 α -グルコシダーゼ添加 unit 量が不十分で消化性オリゴ糖を水解することができないことが示された。
- 6) AOAC 2009.01 法の AMG をブタ小腸粘膜酵素で代替した酵素-HPLC 法による改良変法は、加工食品中の消化性オリゴ糖を水解し、難消化性オリゴ糖と区別して定量できることが明らかになった。また、酵素-HPLC 法による改良変法による定量結果の再現性は高いことが示された。

以上の結果、本研究で提案する AOAC 2009.01 法の酵素-HPLC 法による改良変法は、加工食品中の難消化性オリゴ糖を正確に定量でき、定量法として有用性が高いことが示された。酵素-HPLC 法による改良変法には、検討課題が残されているものの、難消化性オリゴ糖、さらには難消化性糖質の正確な定量法になりうる可能性が期待できる。多種多様な難消化性糖質を包括する定量法を確立することは、栄養成分表示ならびに難消化性糖質摂取量の評価を妥当、かつ正確なものにするために国際的に極めて重要である。難消化性糖質の簡便かつ正確な定量法の確立は、食品産業の発展およびヒトの健康の保持増進に貢献でき、その需要は高い。

VI. 謝辞

本研究の遂行するにあたり、実験計画、実験手法、論文作成にわたり終始御懇篤なご指導・ご鞭撻を賜りました長崎県立大学 名誉教授 奥 恒行先生に謹んで感謝の意を表します。

奥 恒行先生が御退職後、紹介教授としてご指導・ご鞭撻を賜りました長崎県立大学シーボルト校大学院人間健康科学研究科臨床栄養学研究室 教授 大曲勝久先生に深甚の謝意を表します。

また、論文作成にあたり、御懇篤なご指導を賜りました長崎県立大学シーボルト校大学院人間健康科学研究科 助教 中村禎子先生に深勘なる感謝の意を表します。加えて、学位取得にあたり、職務と研究の両立に多大なるご支援を賜りました長崎県立大学シーボルト校看護栄養学部栄養健康学科ならびに大学院人間健康科学研究科教員の皆様、保健栄養学研究室の学生諸氏に心より厚くお礼申し上げます。

最後に本研究にあたり、ブタ小腸を供与して下さった長崎県諫早食肉衛生検査所、フラクトオリゴ糖を供与して下さった明治製菓(株)、難消化性デキストリンならびにセロビオースを供与して下さった松谷化学工業(株)、ラクチュロースを供与して下さった森永乳業(株)、ガラクトシルスクロースを供与して下さった塩水港精糖(株)、イソマルトオリゴ糖を供与して下さった昭和産業(株)、ガラクトオリゴ糖を供与して下さった日新製糖(株)、パラチノースならびにトレハロースを供与して下さった三井製糖(株)、パノースおよびカップリングシュガー[®]を供与して下さった(株)林原、ラクトースを供与して下さった明治乳業(株)、トランスグルコシダーゼ L「アマノ」を供与して下さった天野エンザイム(株)、ラクトレス L3 を供与して下さった大和化成(株)に深謝いたします。

VII. 文献

- 1) Oku T, Nakamura S (2002) Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. *Pure Appl Chem* 74: 1253-61.
- 2) Roberfroid M (1993) Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr* 33: 103-48.
- 3) Roberfroid M, Gibson GR, Delzenne N (1993) The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutr Rev* 51: 137-46.
- 4) Hipsley EH (1953) Dietary "fibre" and pregnancy toxemia. *Br Med J* 2: 420-2.
- 5) Burkitt DP (1971) Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 28: 3-13.
- 6) Trowell H (1972) Crude fiber, dietary fiber and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 16: 138-40.
- 7) Trowell H (1972) Ischemic heart disease and dietary fiber. *Am J Clin Nutr* 25: 926-32.
- 8) 海老原清, 桐山修八 (1990) 食物繊維の物理・化学的性質と生理機能. 日本食品工業雑誌 37, 916-33.
- 9) AACC (2001) The definition of dietary fiber. Report of the Dietary Definition Committee to the Board of Directors of the American Association of Cereal Chemists, *Cereal Foods World* 46: 112-29.
- 10) McConnell AA, Eastwood MA, Mitchell WD (1974) Physical characteristics of vegetable foodstuffs that could influence bowel function. *J Sci Food Agric* 25: 1457-64.
- 11) Takeda H, Kiriyama S (1979) Correlation between the physical properties of dietary fibers and their protective activity against amaranth toxicity in rats. *J Nutr* 109: 388-96.
- 12) Ebihara K, Masuhara R, Kiriyama S, Manabe M (1981) Correlation between viscosity and plasma-glucose and insulin-flattening activities of pectins, from vegetables and fruits in rats. *Nutr Rep Int* 23: 985-92.
- 13) Salyers AA, West SE, Vercellotti JR, Wilkins TD (1977) Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl Environ Microbiol* 34: 529-33.
- 14) Hillman L, Peters S, Fisher A, Pomare EW (1983) Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. *Br J Nutr* 50: 189-95.
- 15) Van Soest PJ, McQueen RW (1973) The chemistry and estimation of fiber. *Proc Nutr Soc* 32: 123.
- 16) Walker DM, Hepburn WR (1955) Normal-acid fiber, a proposed analysis for the evaluation of roughages. I. The analysis of roughages by the normal-acid fiber method and its use for predicting the digestibility of roughages by sheep. *Agric progr* 30: 118-9.
- 17) Van Soest PJ (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residue of low nitrogen content. *J Assoc Off Agric Chem* 46: 825-9.
- 18) Van Soest PJ (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J Assoc Off Agric Chem* 46: 829-35.
- 19) Southgate DA (1969) Determination of carbohydrates in foods. II. Unavailable carbohydrates. *J Sci Food Agric* 20: 331-5

- 20) Englyst HN, Cummings JH (1988) Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J Assoc Off Anal Chem* 71: 808-14.
- 21) Hellendorn EW, Noordhoff MG, Slagman J (1975) Enzymatic determination of the indigestible residue (dietary fibre) content of human food. *J Sci Food Agric* 26: 1461-8.
- 22) Asp NG (1978) In *Dietary Fibre-Current Developments of Importance to Health*, ed. by Heaton, K. W., p.21, John Libbey, London.
- 23) Schweizer TF, Würsch P (1979) Analysis of dietary fiber. *J Sci Food Agric* 30: 613-9.
- 24) Asp NG, Johansson CG (1981) In *The Analysis of Dietary Fiber in Food*, ed. by James, W. P. T. and Theander, O., p.173, Marcel Dekker, New York.
- 25) Asp NG, Johansson CG, Hallmen H, Siljeström M (1983) Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J Agr Food Chem* 31: 476-82.
- 26) Prosky L, Asp NG, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland BF (1984) Determination of total dietary fiber in foods, food products, and total diets-interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* 67: 1044-52.
- 27) Prosky L, Asp NG, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland BF (1985) Determination of total dietary fiber in foods and food products-collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 68: 677-9.
- 28) FDA (1987) Nutrition labeling of food; Caloric content. *Federal Register* 52: 28590-691
- 29) Trowell HC, Southgate DAT, Wolever TMS, Leed AR, Gassull MA, Jenkins DJA (1976) Dietary fiber redefined. *Lancet* 1: 967.
- 30) 桐山修八 (1980) 食物センイの栄養学的効果. *化学と生物* 18, 95-105.
- 31) New Zealand Regulation (1984) Regulation 2(1)
- 32) WHO/FAO (1985) CODEX Alimentarius Commission Food Labeling Committee. *JAFAN* 46: 11.
- 33) Health and Welfare Canada (1985) Report of the expert advisory committee on dietary fibre.
- 34) FDA (1987) Physiological effect and health consequences of dietary fiber. Contact No. FDA 223-84-2059. p.231
- 35) Life Sciences Research Office (1987) Physiological effects and health consequences of dietary fiber. Bethesda, MD; Life Sciences Research Office.
- 36) 桐山修八, 池上幸江, 印南敏 (2003) 日本における dietary fiber の定義・用語・分類をめぐる議論と包括的用語の提案まで. *日本食物繊維研究会誌* 7, 39-49.
- 37) Cummings JH, Englyst HN, Wiggins HS (1986) The role of carbohydrates in lower gut function. *Nutrition Review* 44: 50-4.
- 38) Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A (2010) Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 104: S1-63.
- 39) Cummings JH, Macfarlane GT (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70: 443-59.

- 40) Grabitske HA, Slavin JL (2008) Low-digestible carbohydrates in practice. *J Am Diet Assoc* 108: 1677-81.
- 41) Hashiguchi-Ishiguro M, Nakamura S, Oku T (2009) Inhibitory effects of partially decomposed alginate on production of glucan and organic acid by *Streptococcus sobrinus* 6715. *J Clin Biochem Nutr* 44: 275-9.
- 42) Schrezenmeir J, Vrese M (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73: 61-4.
- 43) Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-12.
- 44) Roberfroid M (2007) Prebiotics: The concept revisited. *J Nutr* 137: S830-7.
- 45) Petith MM, Schedl HP (1976) Intestinal adaptation to dietary calcium restriction: *in vivo* cecal and colonic calcium transport in the rat. *Gastroenterology* 71: 1039-42.
- 46) 奥恒行, 田辺賢一, 渡邊有希, 尾野春子, 成瀬真理, 中村禎子 (2007) 難消化性オリゴ糖の性状の違いがラットのカルシウムならびにマグネシウム代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌 60, 233-40.
- 47) Lora VH, Tore M, Jeffrey IG (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* 22: 283-307.
- 48) Giovanni M, Roberto G, Maurizio C (2011) Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annual Review of Medicine* 62: 361-80.
- 49) 消費者庁 http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin616_01.pdf 「健康食品の表示制度の概要」.
- 50) 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 <https://hfnet.nih.go.jp/usr/kiso/pdf/sa0701007b.pdf> 「特定保健用食品（規格基準型）制度における規格基準」.
- 51) 吉田幹彦 (2013) 食物繊維分析の現状と課題：機能性糖質素材の開発と食品への応用, (井上國世編), p34-43. シーエムシー出版, 東京都.
- 52) Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I (1988) Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* 71: 1017-23.
- 53) Quigley ME, Hudson GJ, Englyst HN (1999) Determination of resistant short-chain carbohydrates (non-digestible oligosaccharides) using gas-liquid chromatography. *Food chemistry* 65: 381-90.
- 54) Ohkuma K, Matsuda I, Katta Y, Tsuji K (2000) New method for determining total dietary fiber by liquid chromatography. *JAOAC Int* 83: 1013-9.
- 55) Kohmoto T, Fukui F, Takaku H, Machida Y, Arai M, Mitsuoka T (1988) Effect of isomaltooligosaccharides on human faecal flora. *Bifidobacteria Microflora* 7: 61-9.
- 56) Kohmoto T, Fukui F, Takaku H, Mitsuoka T (1991) Dose-response test of isomaltooligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria, *Agric Biol Chem* 55: 2157-9.
- 57) Oku T, Nakamura S (2003) Comparison of digestibility and breath hydrogen gas excretion of fructo-oligosaccharide, galactosyl-sucrose, and isomalto-oligosaccharide in healthy human subjects. *Eur*

J Clin Nutr 57: 1150-6.

- 58) 奥恒行 (2005) 難消化吸収性糖質の消化・発酵・吸収ならびに許容量に関する研究. 日本栄養・食糧学会誌 58, 337-42.
- 59) 常広淳, 栗元正二, 金子俊之, 弥武経也 (1999) プロスキー変法を用いたイソマルトオリゴ糖および還元イソマルトオリゴ糖の消化性の評価. 日本食物繊維学会誌 3, 33-8.
- 60) Hoebregs, H (1997) Fructans in foods and food products, ion-exchange chromatographic method: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem Int* 80: 1029-39.
- 61) McCleary BV, Blakeney AB (1999) Measurement of inulin and oligofructan. *Cereal Foods World* 44: 398-406.
- 62) Craig SAS, Holden JF, Khaled MY (2000) Determination of polydextrose as dietary fiber in foods. *J AOAC Int* 83: 1006-12.
- 63) de Slegte J (2002) Determination of trans-galactooligosaccharides in selected food products by ion-exchange chromatography: collaborative study. *J AOAC Int* 85: 417-23.
- 64) McCleary BV, McNally M, Rossiter P (2002) Measurement of resistant starch by enzymatic digestion in starch and selected plant materials: collaborative study. *J AOAC Int* 85: 1103-11.
- 65) (財)日本健康・栄養食品協会 (1999) イソマルトオリゴ糖, イソマルトオリゴ糖含有食品. 試験検査マニュアル(最終版), p192-205. (財)日本健康・栄養食品協会, 東京都.
- 66) (財)日本健康・栄養食品協会 (1999) ガラクトオリゴ糖, ガラクトオリゴ糖含有食品. 試験検査マニュアル(最終版), p167-80. (財)日本健康・栄養食品協会, 東京都.
- 67) (財)日本健康・栄養食品協会 (1999) フラクトオリゴ糖, フラクトオリゴ糖含有食品. 試験検査マニュアル(最終版), p140-53. (財)日本健康・栄養食品協会, 東京都.
- 68) (財)日本健康・栄養食品協会 (1999) 乳果オリゴ糖, 乳果オリゴ糖含有食品. 試験検査マニュアル(最終版), p215-24. (財)日本健康・栄養食品協会, 東京都.
- 69) (財)日本健康・栄養食品協会 (1999) 大豆オリゴ糖(スタキオース, ラフィノース), 大豆オリゴ糖(スタキオース, ラフィノース)含有食品-大豆オリゴ糖含有飲料-, 大豆オリゴ糖(スタキオース, ラフィノース)-デキストリンを含む大豆オリゴ糖含有食品-. 試験検査マニュアル(最終版), p154-66. (財)日本健康・栄養食品協会, 東京都.
- 70) (財)日本健康・栄養食品協会 (1999) 難消化性デキストリン, 難消化性デキストリン含有食品. 特定保健用食品試験検査マニュアル, p29-37. (財)日本健康・栄養食品協会, 東京都.
- 71) 福増潤二 (2013) 難消化性オリゴ糖分析の現状と課題: 機能性糖質素材の開発と食品への応用, (井上國世編), p34-43. シーエムシー出版, 東京都.
- 72) 消費者庁 <http://www.caa.go.jp/foods/index4.html> 「特定保健用食品許可(承認)品目一覧」(平成26年2月27日 accessed) .
- 73) 藤本佳則 (2013) 各種オリゴ糖の機能と飲食品への応用: 機能性糖質素材の開発と食品への応用, (井上國世編), p34-43. シーエムシー出版, 東京都.
- 74) Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses 32th Session (2010) Draft table of Conditions for Methods of Analysis for Dietary Fibre.

REP11/NFSDU 2 and Appendix IV.

- 75) FDA <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2010-title21-vol2/pdf/CFR-2010-title21-vol2-sec101-9.pdf>
“Food and Drug Administration, HHS”.
- 76) 奥恒行 (2012) 食品素材としてのルミナコイド~食物繊維,難消化吸収性単糖・オリゴ糖,糖アルコール~. 日本食品新素材研究会誌 14, 41-5.
- 77) IUB-IUPAC (1982) Abbreviated terminology of oligosaccharide chains-recommendations 1980-IUB-IUPAC joint commission on biochemical nomenclature (JCBN). *J Bio Chem* 257: 3347-51.
- 78) IUB-IUPAC (1982) Polysaccharide nomenclature-recommendations 1980-IUB-IUPAC joint commission on biochemical nomenclature (JCBN). *J Bio Chem*, 257: 3352-4.
- 79) Tanabe K, Nakamura S, Oku T (2011) Fatal imperfection of enzymatic-HPLC quantitative method for non-digestible oligosaccharides and its proposed solution strategy newly quantitative method for non-digestible oligosaccharides. *Curr Nutr Food Sci* 7: 209-15.
- 80) Tanabe K, Nakamura S, Oku T (2013) Inaccuracy of AOAC method 2009.01 with amyloglucosidase for measuring non-digestible oligosaccharides and proposal for an improvement of the method. *Food Chem* 151: 539-46.
- 81) Oku T, Yamada M, Nakamura M, Sadamori N, Nakamura S (2006) Inhibitory effects of extractives from leaves of *Morus alba* on human and rat small intestinal disaccharidase activity. *Br J Nutr* 95: 933-8.
- 82) Dahlqvist A (1964) Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 7: 18-25.
- 83) Oku T, Konishi F, Hosoya N (1982) Mechanism of inhibitory effect of unavailable carbohydrate on intestinal calcium absorption. *J Nutr* 112: 410-5.
- 84) Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- 85) Kessler M, Acuto O, Storelli C, Murer H, Müller M, Semenza G (1978) A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. *Biochim Biophys Acta* 506: 136-54.
- 86) Halvolson HO, Winderman S, Gorman J (1963) Comparison of the alpha-glucosidases of *Saccharomyces* produced in response to five non-allelic maltose genes. *Biochim Biophys Acta* 67: 42-53.
- 87) Oku T, Tokunaga T, Hosoya N (1984) Nondigestibility of a new sweetener, "Neosugar," in the rat. *J Nutr* 114: 1574-81.
- 88) Ohtsuka K, Tsuji K, Nakagawa Y, Ueda H, Ozawa O, Uchida T, Ichikawa T (1990) Availability of 4'galactosyllactose (*O*-β-D-galactopyranosyl-(1->4)-*O*-β-D-glucopyranose) in rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 36: 265-76.
- 89) Ruttloff H, Täufel A, Krause W, Haenel H, Täufel K (1967) Die intestinal-enzymatische spaltung von galakto-oligosacchariden im darm von tier und menschen mit besonderer berücksichtigung von *Lactobacillus bifidus*. II. Mitt. Zum intestinalen verhalten der lactulose. *Nahrung*. 11: 39-46.

- 90) Dalqvist A, Nordstrom C (1962) The distribution of disaccharidase activities in the villi and crypt of the small intestinal mucosa. *Biochem Biophys Acta* 113: 624-6.
- 91) 合田敏尚, 細谷憲政 (1983) ラット小腸粘膜の二糖類水解酵素によるパラチノースの水解について. *日本栄養・食糧学会誌* 36, 169-73.
- 92) 山田和彦, 合田敏尚, 細谷憲政, 森内幸子 (1981) 白ネズミ小腸粘膜の二糖類水解酵素によるグルコシルスクロースならびにマルトシルスクロースの水解様式. *栄養と食糧* 34, 133-7.
- 93) 山田和彦, 佐々木光美, 森内幸子, 細谷憲政 (1978) 白ネズミ小腸粘膜刷子縁におけるグルコシルスクロースならびにマルトシルスクロースの水解能. *栄養と食糧* 31, 267-72.
- 94) Gudmand-Høyer E, Skovbjerg H (1996) Disaccharide digestion and maldigestion. *Scand J Gastroenterol Suppl* 216: 111-21.
- 95) Oku T, Tanabe K, Ogawa S, Sadamori N, Nakamura S (2011) Similarity of hydrolyzing activity of human and rat small intestinal disaccharidases. *Clin Exp Gastroenterol* 4: 155-61.
- 96) Kohmoto T, Tsuji K, Kaneko T, Shiota M, Fukui F, Takaku H, Nakagawa Y, Ichikawa T, Kobayashi S (1992) Metabolism of ¹³C-isomaltooligosaccharides in healthy men. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 937-40.
- 97) McCleary BV, DeVries JW, Rader JI, Cohen G, Prosky L, Mugford DC, Champ M, Okuma K (2010) Determination of total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. *J AOAC Int* 93: 221-33.
- 98) Manjunath P, Shenoy BC, Raghavendra Rao MR (1983) Fungal glucoamylases. *J Appl Biochem* 5: 235-60.
- 99) 松井博和 (2003) グルコアミラーゼ : 澱粉科学の事典, (不破英次他編), p.266-70. 朝倉書店, 東京都.
- 100) Pazur JH, Kleppe K (1962) The hydrolysis of alpha-D-glucosides by amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *J Biol Chem* 237: 1002-6.
- 101) 竹内叶 (1996) グリコシルスクロース : オリゴ糖の新知识, (早川幸男編), p81-93. 食品化学新聞社, 東京都.
- 102) 中久喜輝男 (1996) パノース高含有シロップ : オリゴ糖の新知识, (早川幸男編), p184-96. 食品化学新聞社, 東京都.
- 103) 加藤工成 (1996) イソマルトオリゴ糖 : オリゴ糖の新知识, (早川幸男編), p.167-83. 食品化学新聞社, 東京都.
- 104) McCleary BV (2007) An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. *Anal Bioanal Chem* 389: 291-308.
- 105) 奥恒行 (1986) 新しい糖質甘味料フラクトオリゴ糖の生体利用とその用途. *栄養学雑誌* 44, 291-306.
- 106) 石川文保, 高山博夫, 松本圭介, 伊藤正紀, 長南治, 出口ヨリ子, 菊池 (早川) 弘子, 綿貫雅章 (1995) β 1-4 系ガラクトオリゴ糖のヒト腸内菌叢に及ぼす影響. *ビフィズス* 9, 5-18.

- 107)Saunders DR, Wiggins HS (1981) Conservation of mannitol, lactulose, and raffinose by the human colon. *Am J Physiol* 241: G397-402.
- 108)Antje Chang (2009) SPRINGER Handbook of Enzymes Volume 12 Class 3.2 Hydrolases VII EC 3.2.1.1-3.2.1.47 (Schomburg Dietmar, Chang, Antje, Schomburg, D, Schomburg, Ida eds), p59-87. Springer Science+Business Media, Berlin.
- 109)Antje Chang (2009) SPRINGER Handbook of Enzymes Volume 12 Class 3.2 Hydrolases VII EC 3.2.1.1-3.2.1.47 (Schomburg Dietmar, Chang, Antje, Schomburg, D, Schomburg, Ida eds), p260-93. Springer Science+Business Media, Berlin.
- 110)Antje Chang (2009) SPRINGER Handbook of Enzymes Volume 12 Class 3.2 Hydrolases VIII EC 3.2.1.48-3.2.1.149 (Schomburg Dietmar, Chang, Antje, Schomburg, D, Schomburg, Ida eds), p1-9. Springer Science+Business Media, Berlin.
- 111)Kita A, Matsui H, Somoto A, Kimura A, Takata M, Chiba S (1991) Substrate specific and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from a *Aspergillus niger*. *Agric Biol Chem* 55: 2327-35.
- 112)Sjöström H, Norén O, Christiansen L, Wacker H, Semenza G (1980) A fully active, two-active-site, single-chain sucrase.isomaltase from pig small intestine. Implications for the biosynthesis of a mammalian integral stalked membrane protein. *J Biol Chem* 255: 11332-8.
- 113)Sørensen SH, Norén O, Sjöström H, Danielsen EM (1982) Amphiphilic pig intestinal microvillus maltase/glucoamylase. Structure and specificity. *Eur J Biochem* 126: 559-68.
- 114)Skovbjerg H, Norén O, Sjöström H, Danielsen EM, Enevoldsen BS (1982) Further characterization of intestinal lactase/phlorizin hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 707: 89-97.
- 115)Conklin KA, Yamashiro KM, Gray GM (1975) Human intestinal sucrase-isomaltase. Identification of free sucrase and isomaltase and cleavage of the hybrid into active distinct subunits. *J Biol Chem* 250: 5735-41.
- 116)Naim HY, Sterchi EE, Lentze MJ (1988) Structure, biosynthesis, and glycosylation of human small intestinal maltase-glucoamylase. *J Biol Chem* 263: 19709-17.
- 117)Handan K, Robert WH (2000) Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 2682-4.
- 118)Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66: 365-78.
- 119)McKellar RC, Modler HW (1989) Metabolism of fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium spp.* *Appl Microbiol Biotechnol* 31: 537-41.
- 120)Ohtsuka K, Tanoh A, Ozawa O, Kanematsu T, Uchida T, Shinke R (1990) Purification and properties of β -galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *J Ferment Bioeng* 70: 301-7
- 121)Fischer L, Scheckermann C, Wagner F (1993) Purification and characterization of a thermotolerant β -galactosidase from *Thermomyces lauginosa*. *Appl Environ Microbiol* 61: 1497-501.
- 122)Zheng YG, Shentu XP, Shen YC (2005) Inhibition of porcine small intestinal sucrase by valienamine. *J Enzyme Inhib Med Chem* 20: 49-53.

- 123) Nishibata T, Tashiro K, Kanahori S, Hashizume C, Kitagawa M, Okuma K, Gordon DT (2009) Comprehensive measurement of total non-digestible carbohydrates in foods by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 57: 7659-65.
- 124) Brunt K, Sanders P (2013) Improvement of the AOAC 2009.01 total dietary fibre method for bread and other high starch containing matrices. *Food Chem* 140: 574-80.
- 125) 消費者庁 <http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin611.pdf> 「栄養成分表示運用上の問題点～試験機関の立場から～」.
- 126) 田辺賢一, 中村禎子, 奥恒行 (2008) 難消化性オリゴ糖の性状の違いがラットの成長, 高浸透圧性下痢誘発, 脂質代謝, 糞便有害菌酵素活性ならびに短鎖脂肪酸産生に及ぼす影響. 日本食物繊維学会誌, 12, 17-29.
- 127) McCleary BV, DeVries JW, Rader JI, Cohen G, Prosky L, Mugford DC, Okuma K (2012) Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. *JAOAC Int* 95: 824-44.
- 128) Westenbrink S, Brunt K, van der Kamp JW (2013) Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data. *Food Chem* 140: 562-7.
- 129) Brownawell AM, Caers W, Gibson GR, Kendall CW, Lewis KD, Ringel Y, Slavin JL (2012) Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals. *J Nutr* 142: 962-74.

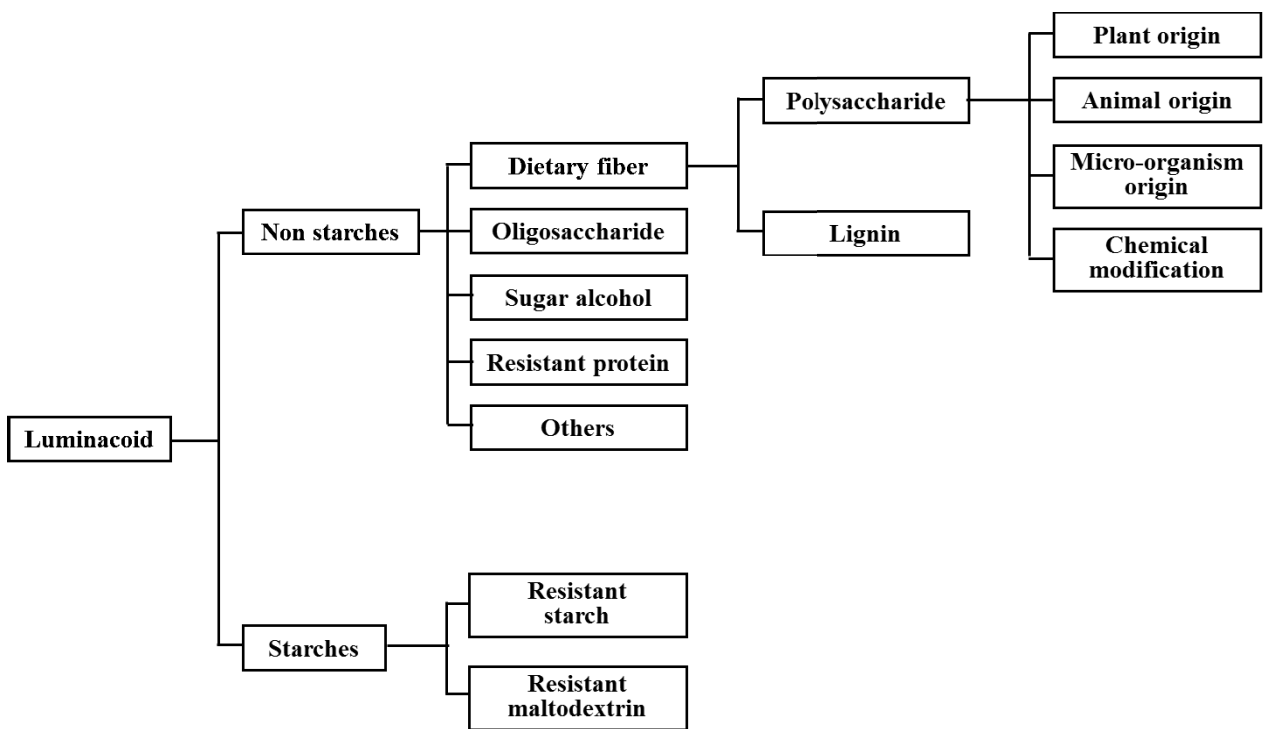


Fig. 1 Classification of “Luminacoid”³⁶⁾

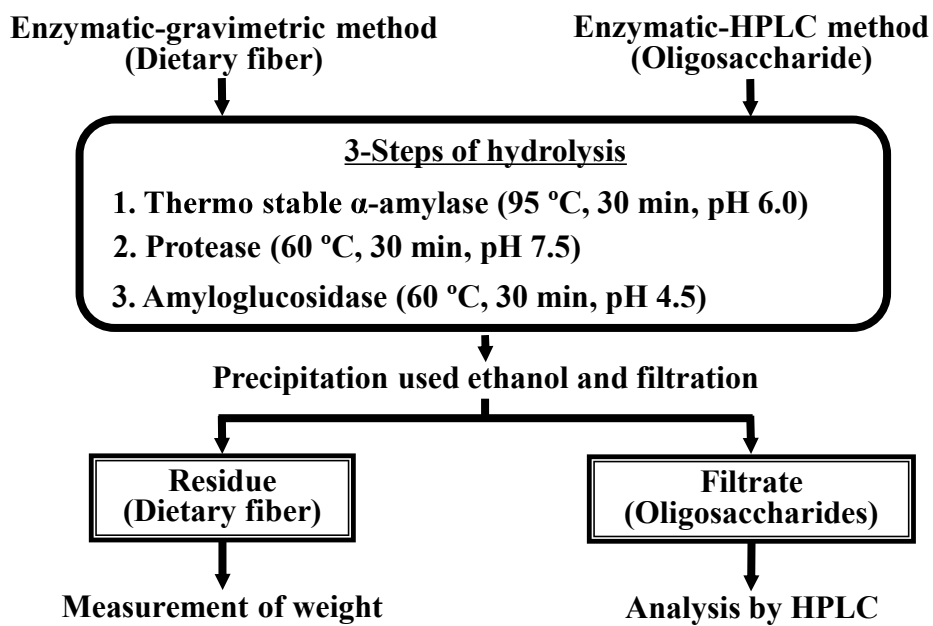


Fig. 2 Procedure schemes of AOAC 2001.03 method for measurement of dietary fiber and oligosaccharide⁵⁷⁾

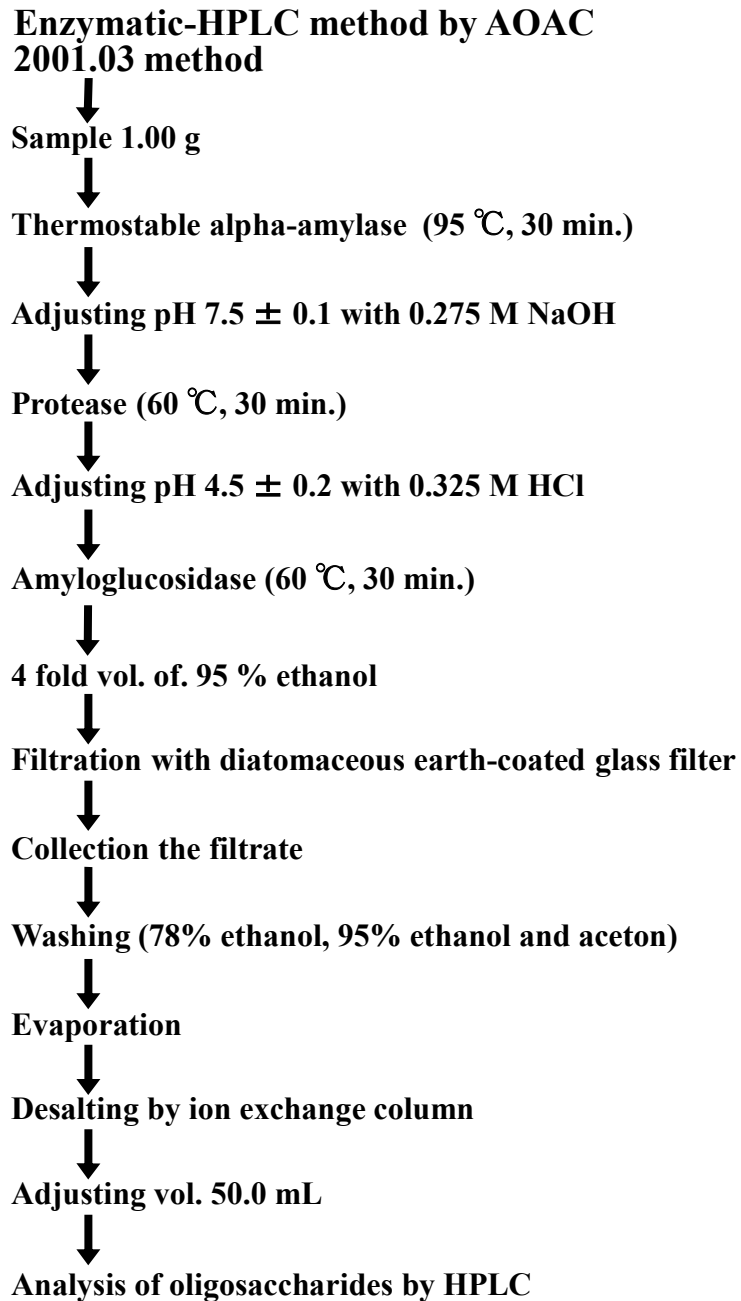


Fig. 3 Procedure schemes of the enzymatic-HPLC method by AOAC 2001.03 method

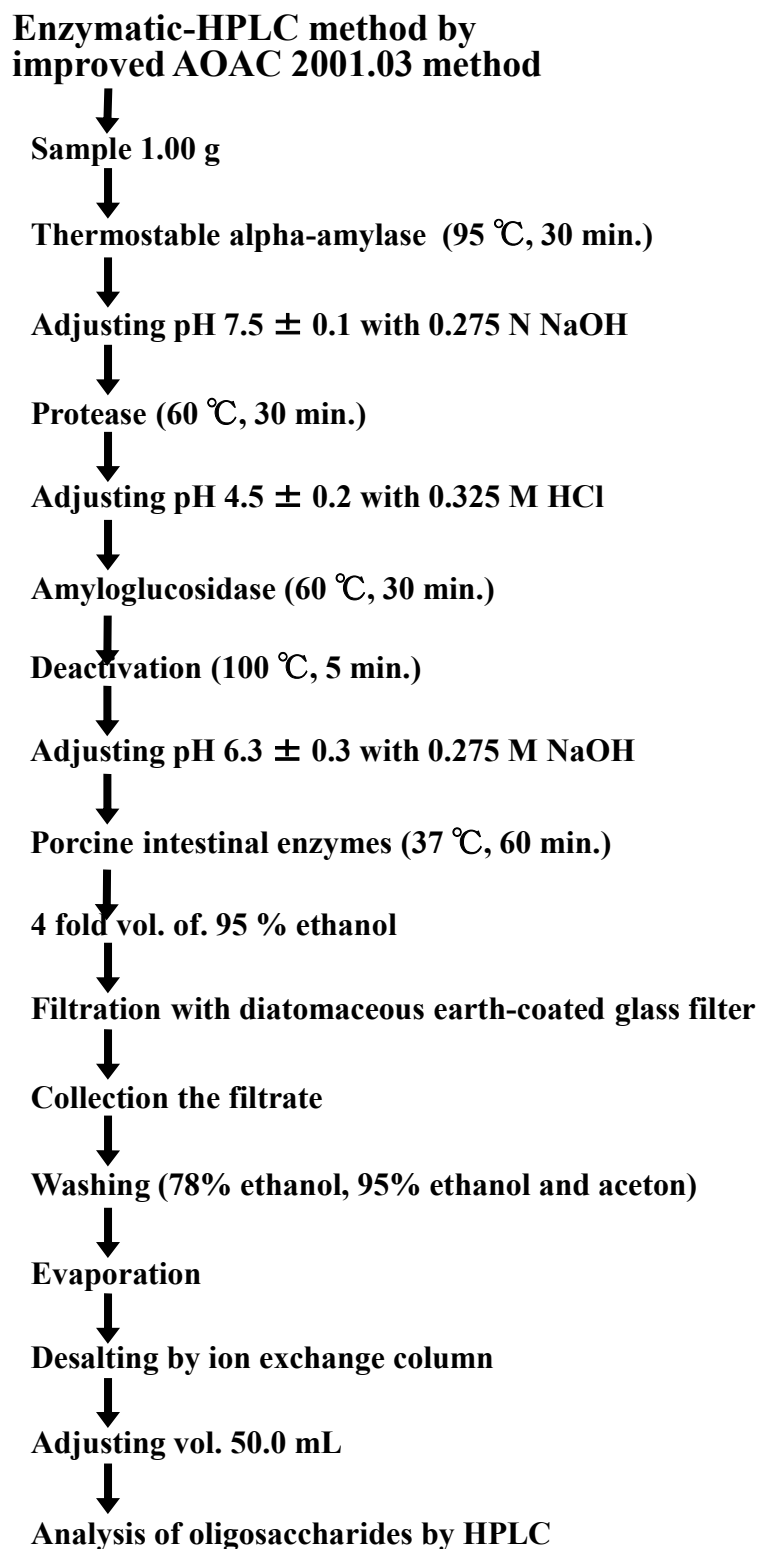


Fig. 4 Procedure schemes of enzymatic-HPLC method by improved AOAC 2001.03 method

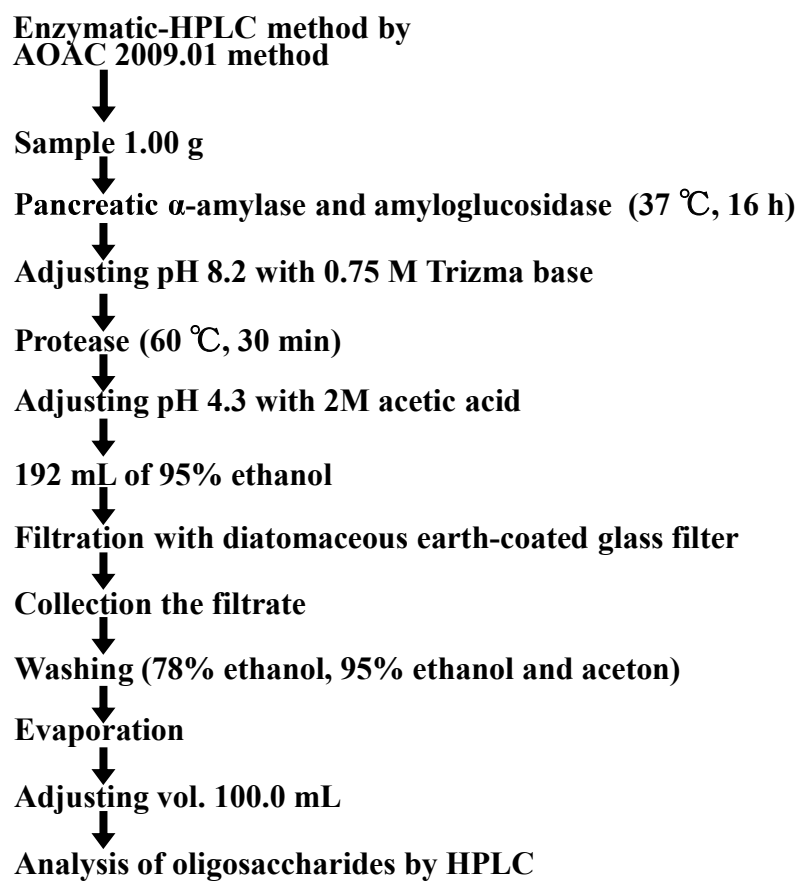


Fig. 5 Procedure scheme of the enzymatic-HPLC method using the enzymes from AOAC 2009.01 method

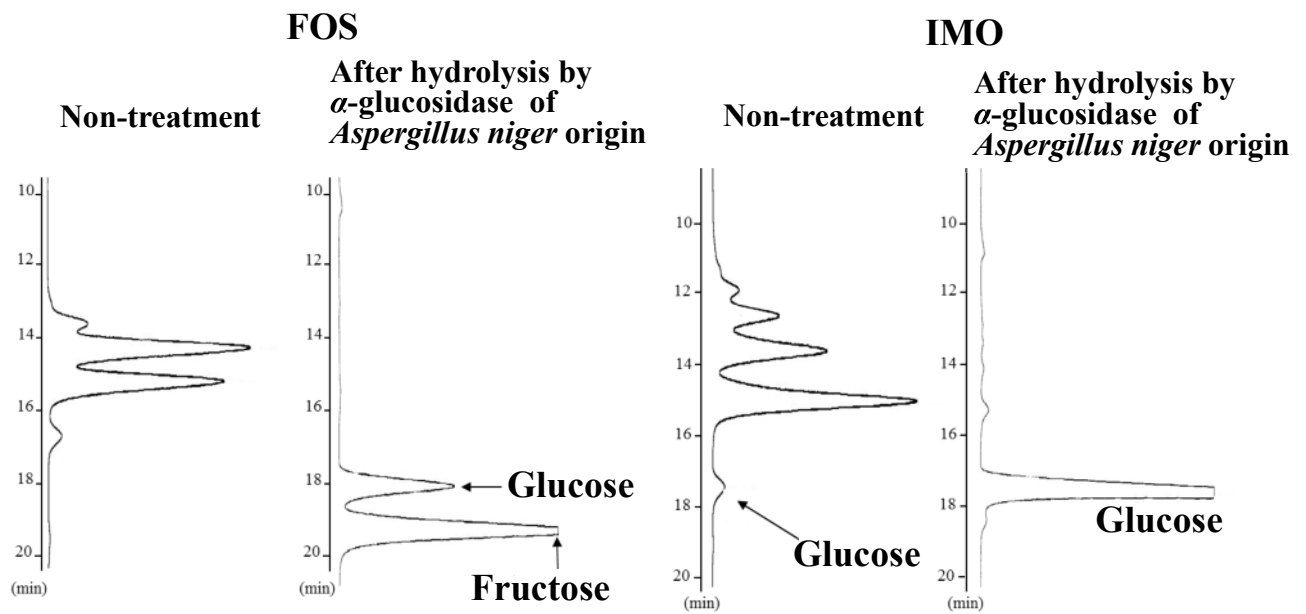


Fig. 6 HPLC profiles of hydrolysate of fructooligosaccharide and isomaltoligosaccharide using α -glucosidase of *Aspergillus niger* origin

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzymes. FOS, fructooligosaccharide; IMO, isomaltoligosaccharide.

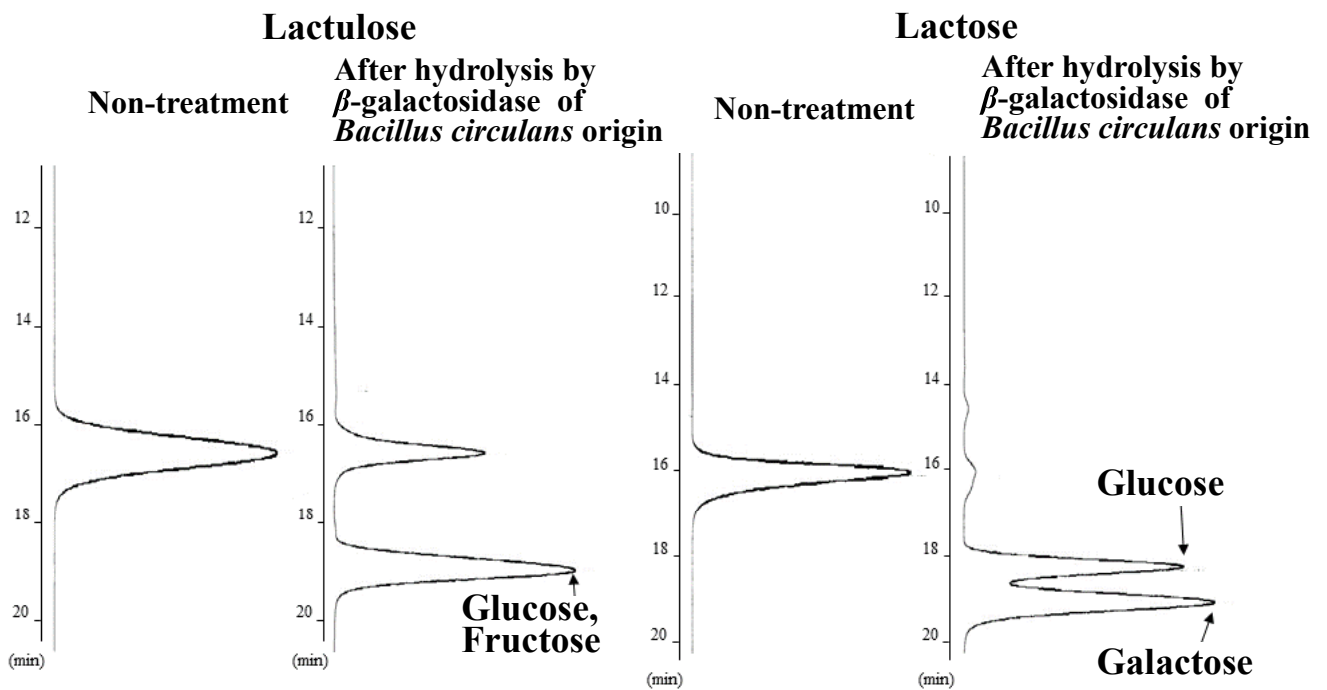


Fig. 7 HPLC profiles of hydrolysate of lactulose and lactose using β -galactosidase of *Bacillus circulans* origin

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzymes.

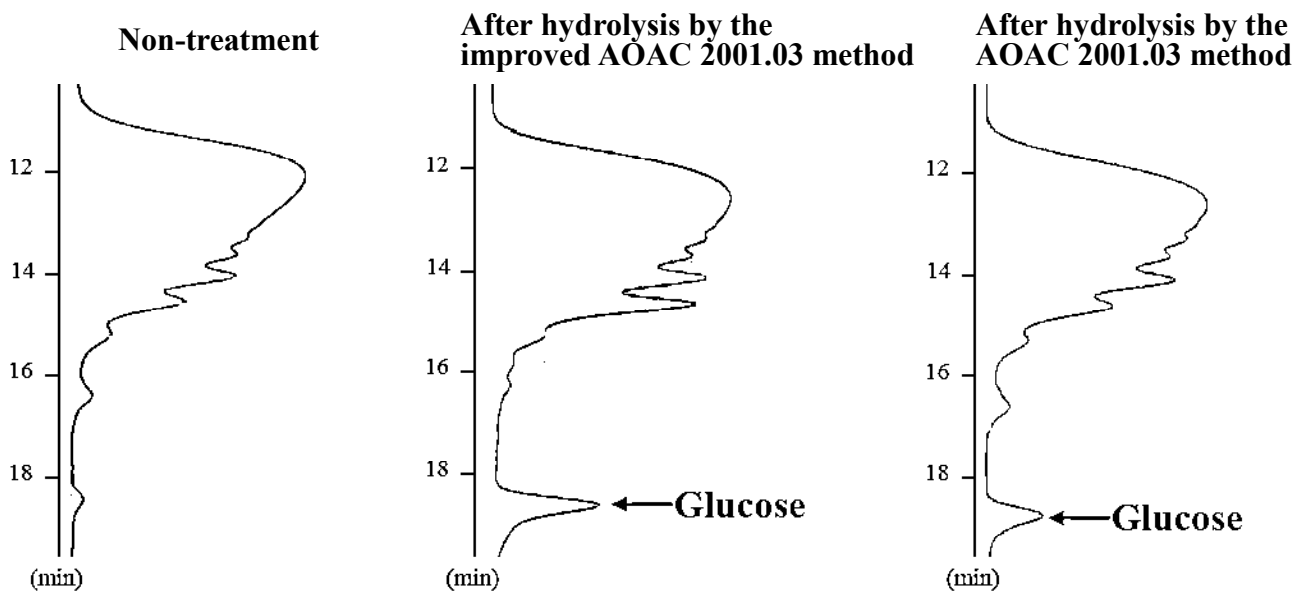


Fig. 8 HPLC profiles of hydrolysate of resistant maltodextrin by the improved AOAC 2001.03 method and the AOAC 2001.03 method

Enzymes of the improved AOAC 2001.03 method were porcine intestinal BBMV and the enzymes of the AOAC 2001.03 method.

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzyme of each methods.

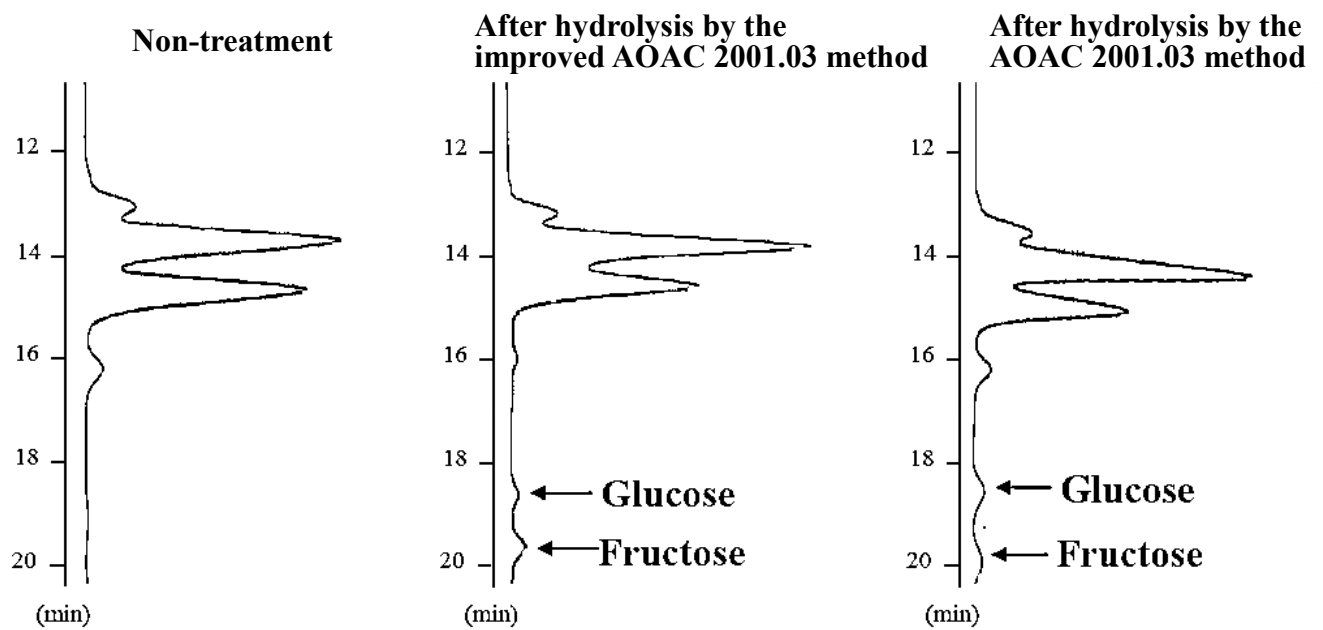


Fig. 9 HPLC profiles of hydrolysate of fructo-oligosaccharide by the improved AOAC 2001.03 method and the AOAC 2001.03 method

Enzymes of the improved AOAC 2001.03 method were porcine intestinal BBMV and the enzymes of the AOAC 2001.03 method. "Non-treatment", an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzyme of each methods.

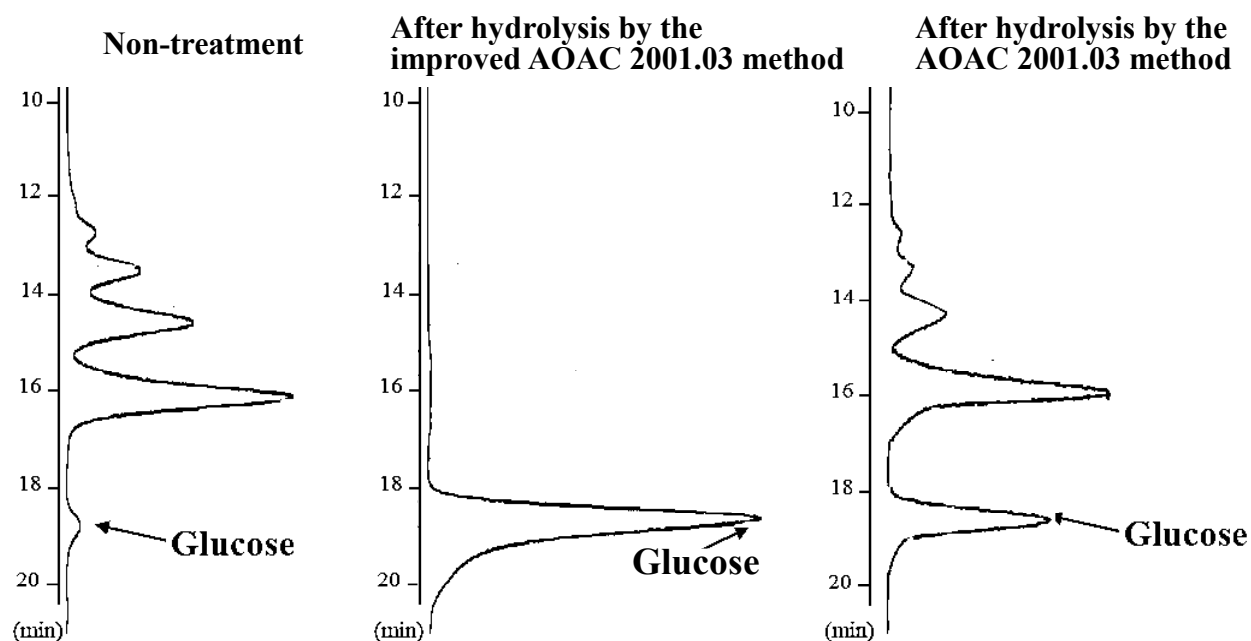


Fig. 10 HPLC profiles of hydrolysate of isomaltooligosaccharide by the improved AOAC 2001.03 method and AOAC 2001.03 method

Enzymes of the improved AOAC 2001.03 method were porcine intestinal BBMV and the enzymes of the AOAC 2001.03 method.

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzyme of each methods.

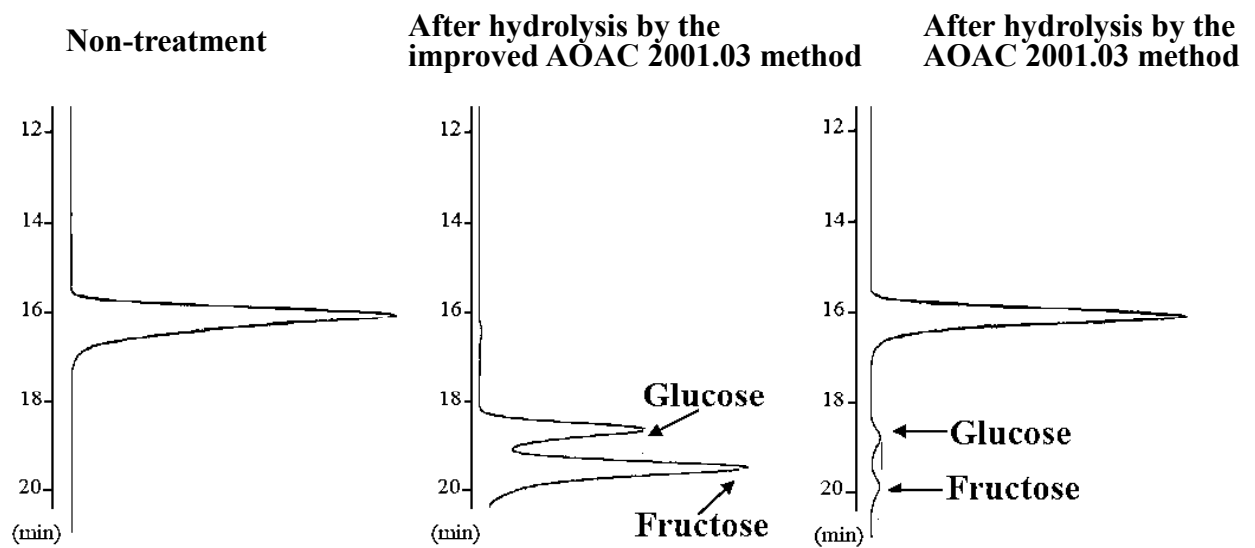


Fig. 11 HPLC profiles of hydrolysate of sucrose by the improved AOAC 2001.03 method and the AOAC 2001.03 method

Enzymes of the improved AOAC 2001.03 method were porcine intestinal BBMV and the enzymes of the AOAC 2001.03 method.

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzyme of each methods.

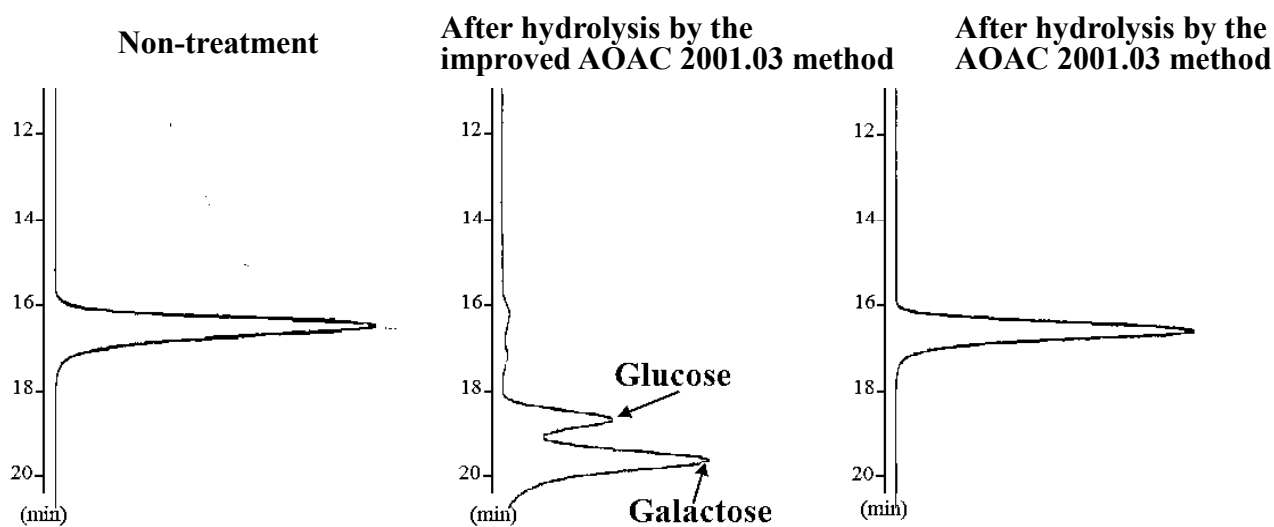


Fig. 12 HPLC profiles of hydrolysate of lactose by the improved AOAC 2001.03 method and the AOAC 2001.03 method

Enzymes of the improved AOAC 2001.03 method were porcine intestinal BBMV and the enzymes of the AOAC 2001.03 method.

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzyme of each methods.

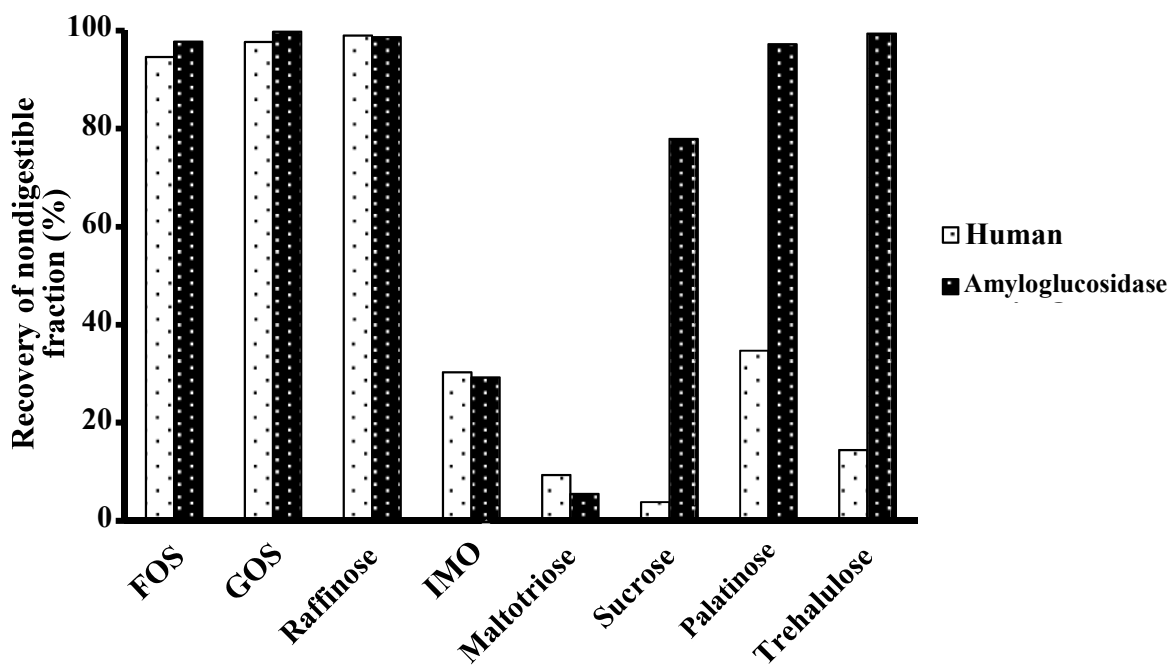


Fig. 13 Comparison of recovery of intact oligosaccharide using human small intestinal homogenates and amyloglucosidase

Data were expressed as the recovery of nondigestible fraction after the reaction mixture for the enzyme assay (37°C, 16h) and the mean of duplicated data. FOS, fructooligosaccharide; GOS, galactooligosaccharide; IMO, isomaltooligosaccharide.

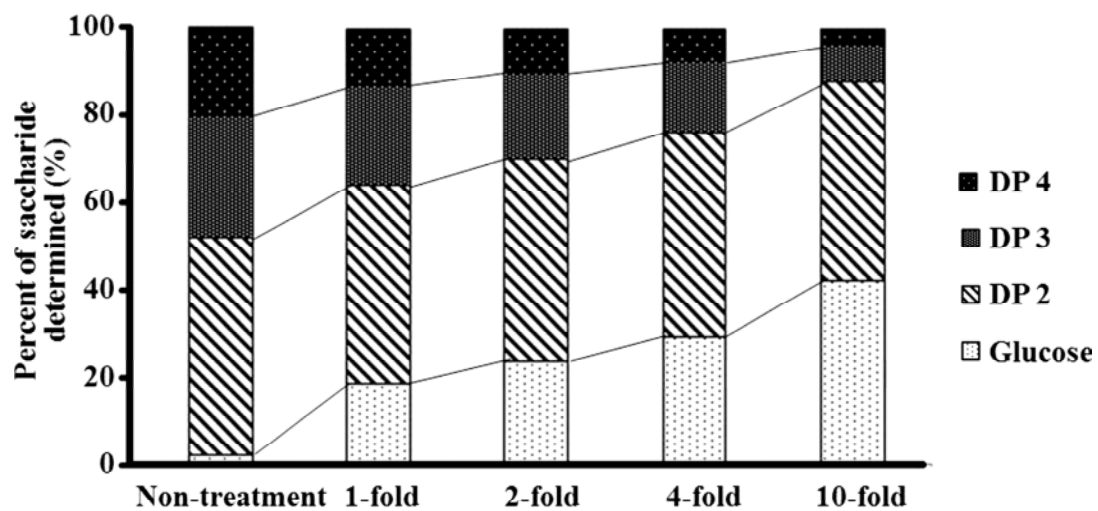


Fig. 14 Dose dependent changes of hydrolysates of isomaltooligosaccharide by amyloglucosidase

Analytical values were expressed as the mean of duplicated data. Non-treatment, an equal quantity of oligosaccharide was treated with buffer alone instead of the hydrolyzing enzymes of AOAC 2009.01 method; 1-fold, amount of amyloglucosidase specified in AOAC 2009.01 method (3.4 unit/mL); 2-fold, 2-fold amount of amyloglucosidase (6.8 unit/mL); 4-fold, 4-fold amount of amyloglucosidase (13.6 unit/mL); 10-fold, 10-fold amount of amyloglucosidase (34.0 unit/mL).

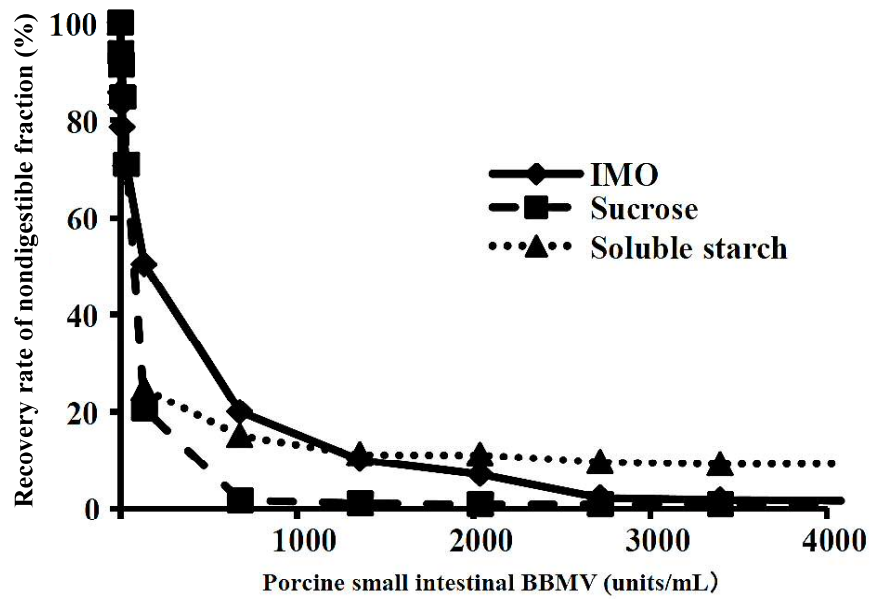


Fig. 15 Effect of added porcine small intestinal brush border membrane vesicles on the measured level as non-digestible oligosaccharide of isomaltooligosaccharide, sucrose and soluble starch

Analytical values were expressed as the mean of duplicated data. Nondigestible fraction is DP 2 or more. IMO, isomaltooligosaccharide.

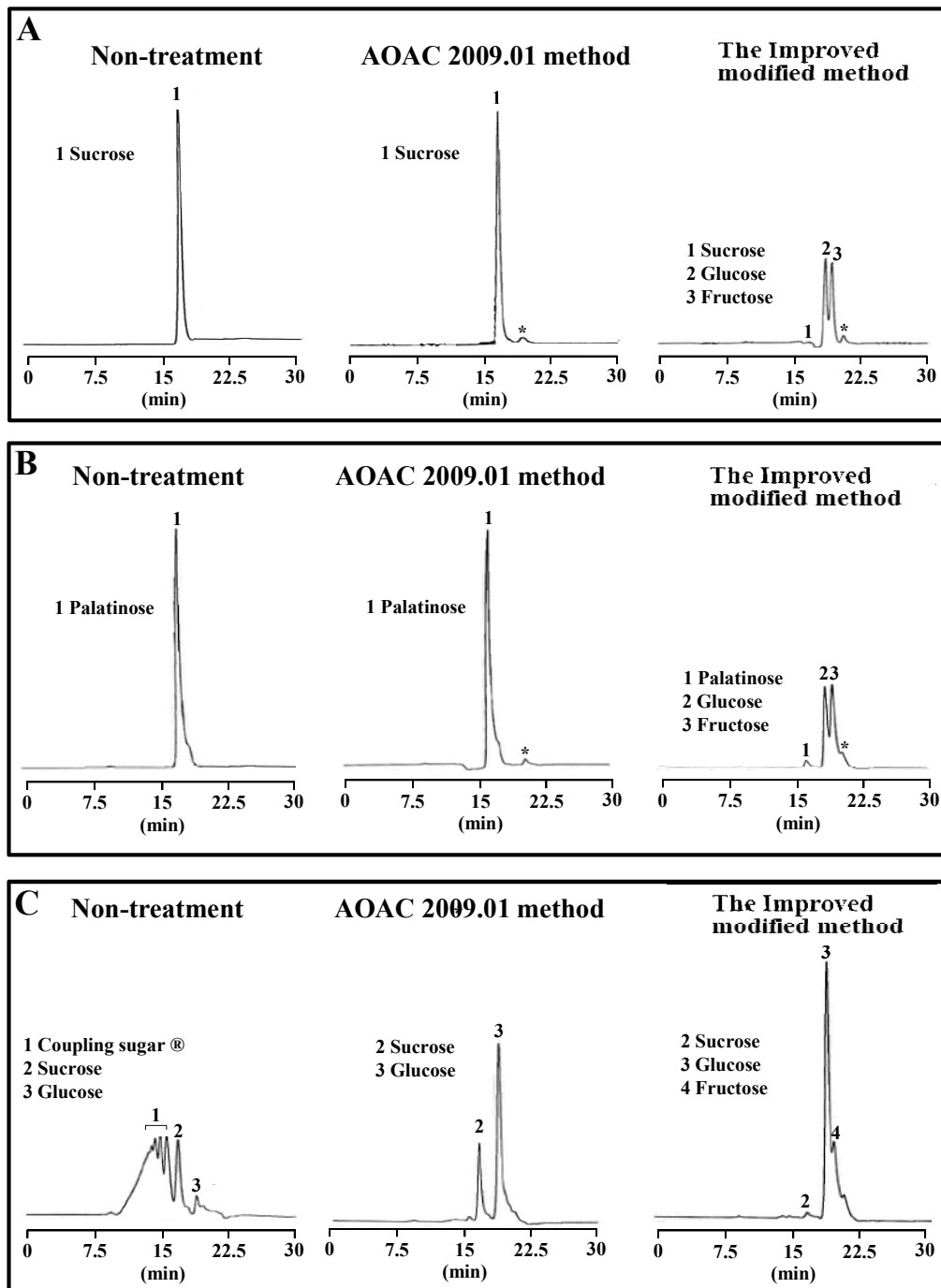


Fig. 16 HPLC profiles of hydrolysate of polymeric digestible saccharide such as sucrose (A), palatinose (B) and coupling sugar® (C) by the AOAC 2009.01 method and its improved modified method using porcine intestinal enzymes

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzymes. *, glycerol.

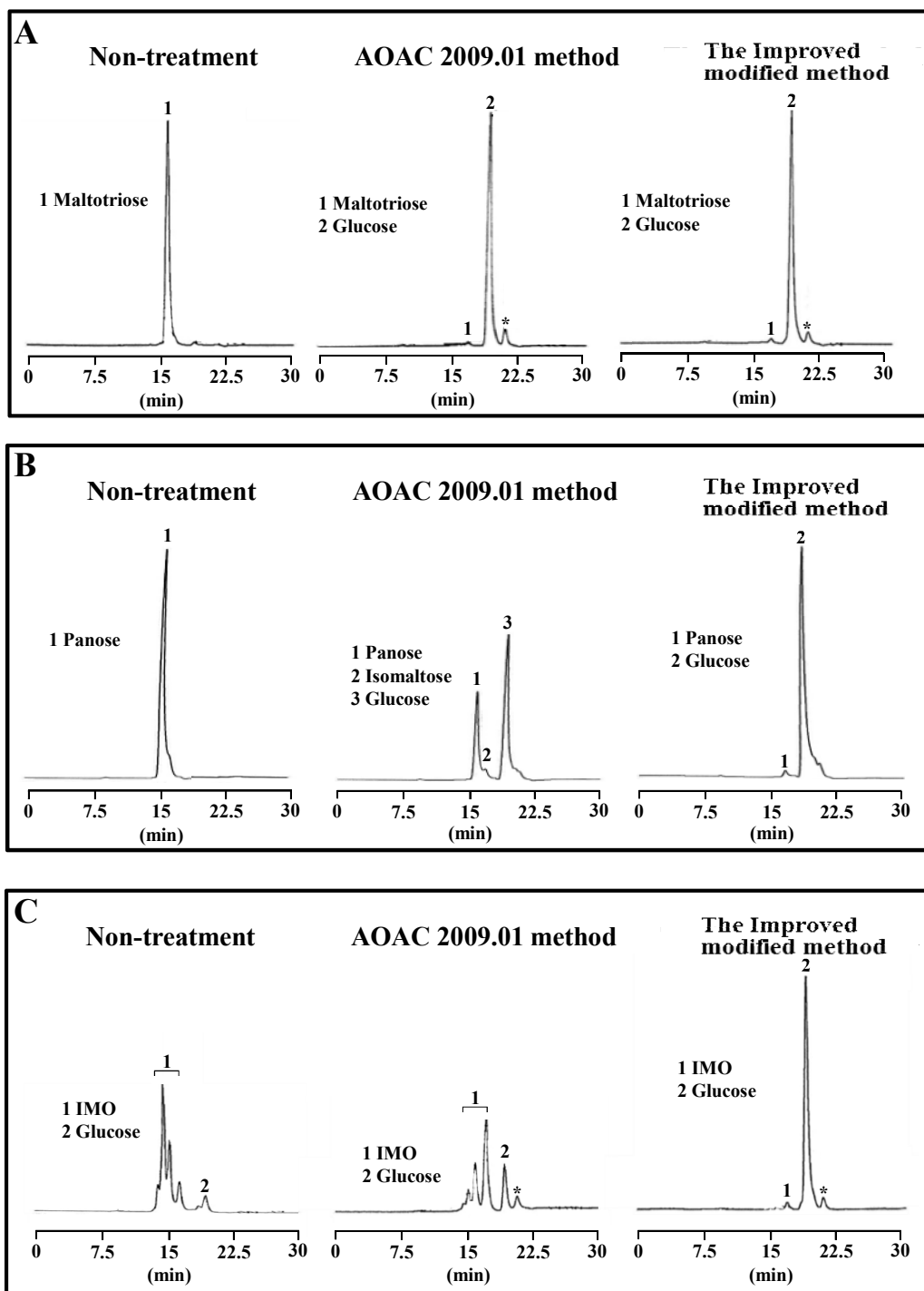


Fig. 17 HPLC profiles of hydrolysate of monomeric digestible saccharide such as maltotriose (A), panose (B) and isomaltooligosaccharide (C) by the AOAC 2009.01 method and its improved modified method using porcine intestinal enzymes

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzymes. *, glycerol.

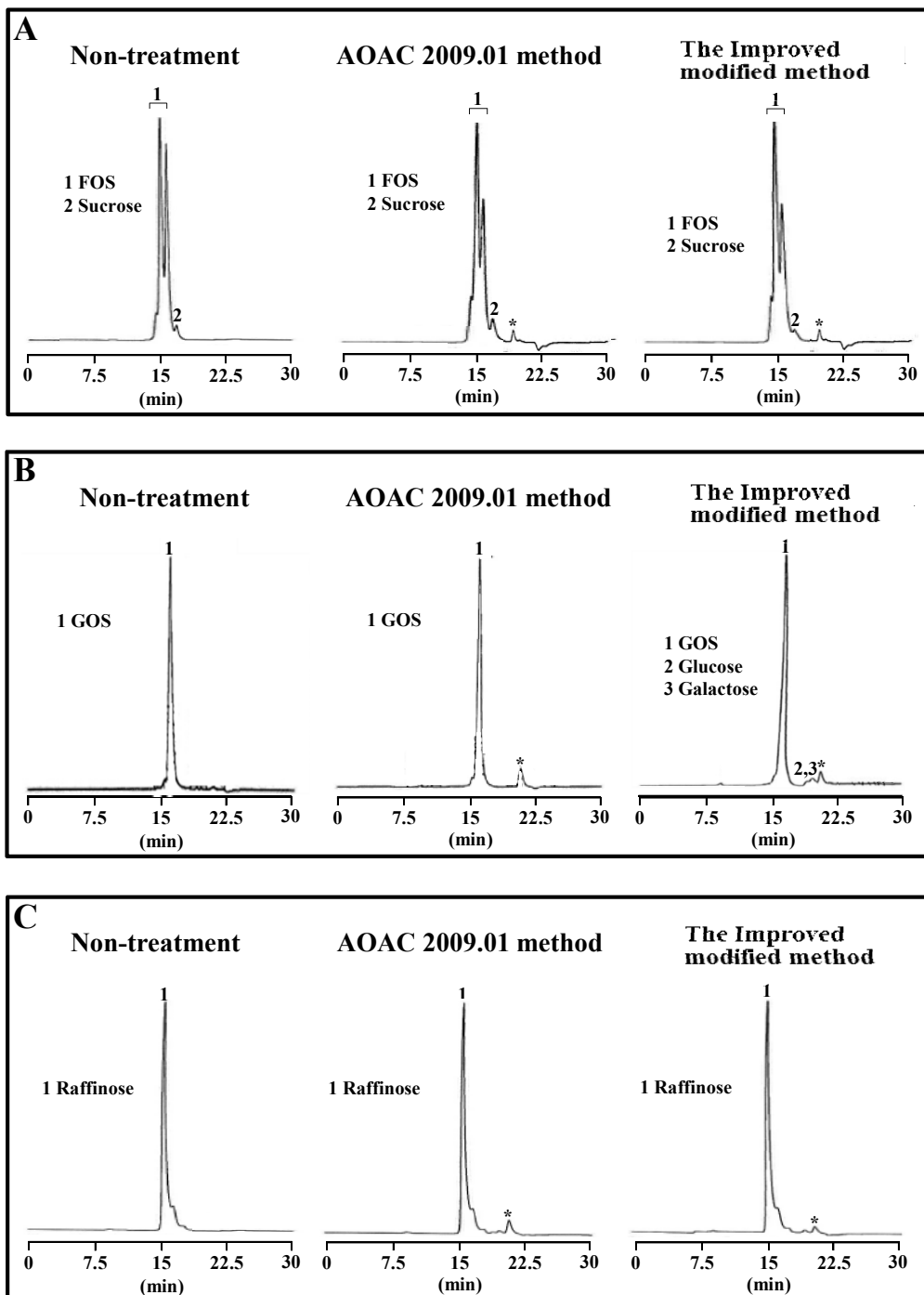


Fig. 18 HPLC profiles of hydrolysate of non-digestible oligosaccharide such as fructooligosaccharide (A), galactooligosaccharide (B) and raffinose (C) by the AOAC 2009.01 method and its improved modified method using porcine intestinal enzymes

“Non-treatment”, an equal quantity of nondigestible oligosaccharide has not been treated by hydrolyzing enzymes. *, glycerol.

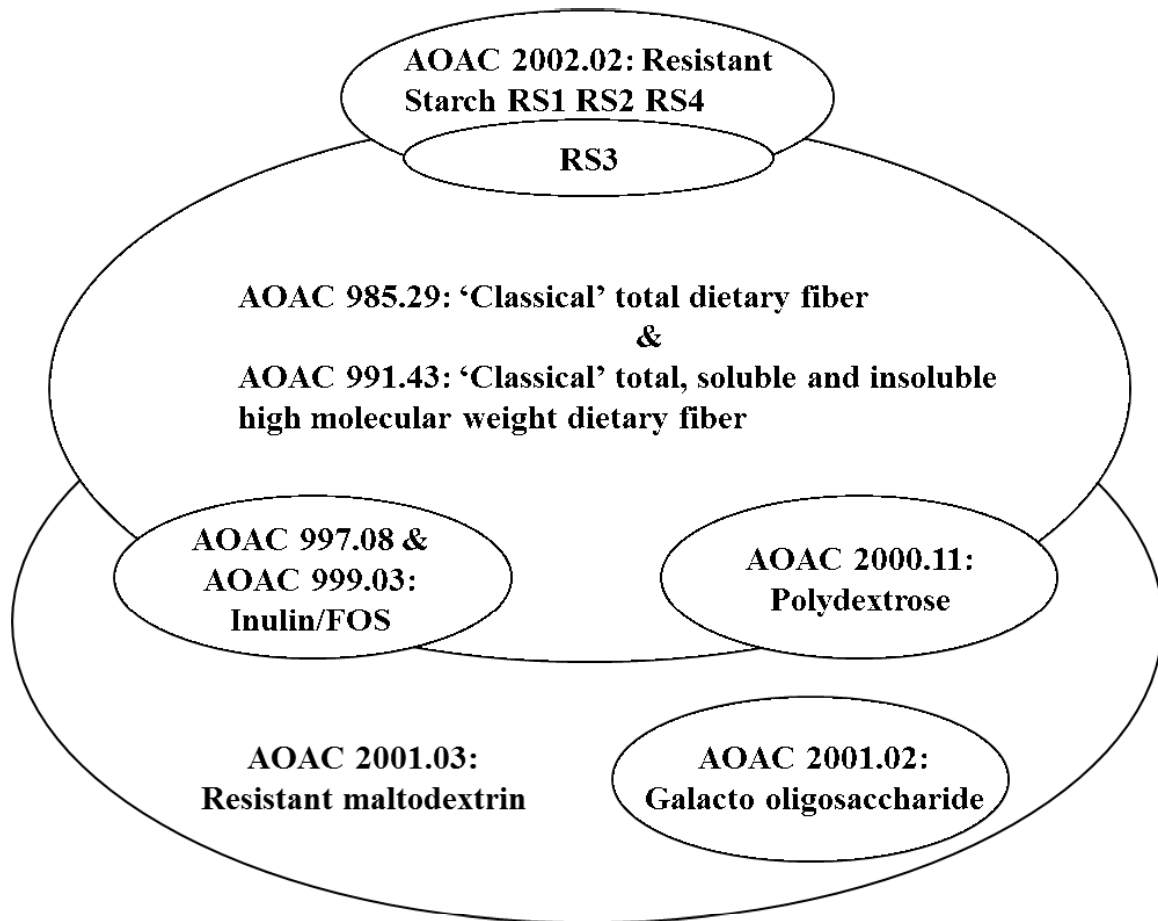


Fig. 19 Schematic overview of analytical methods for dietary fiber fractions before the development of AOAC 2009.01 method⁹⁷⁾

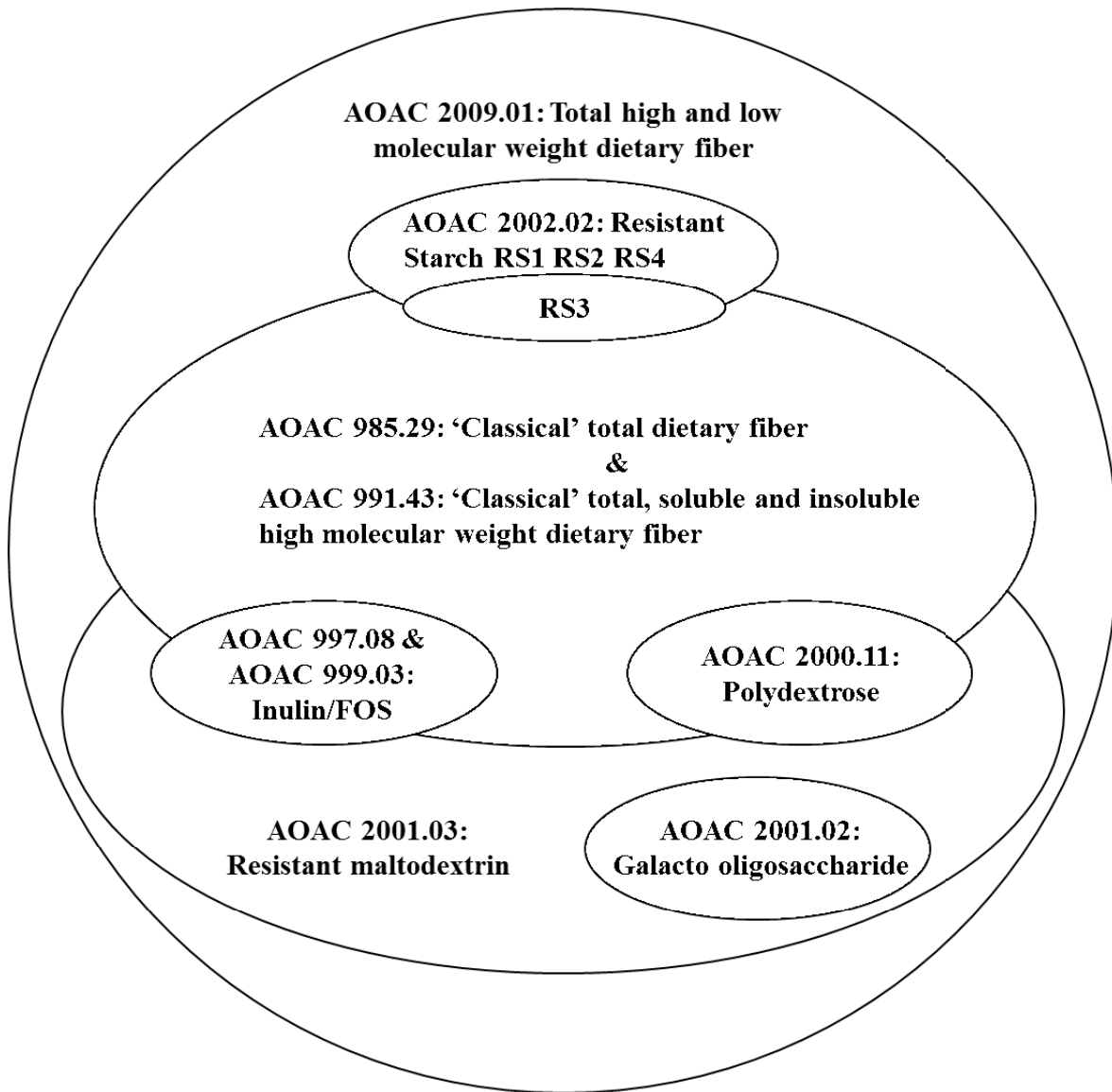


Fig. 20 Schematic overview of analytical methods for dietary fiber fractions after the development of AOAC 2009.01 method⁹⁷⁾

Table 1 History of “Dietary fiber” from 1972 to 2003

Personal / Country / Organization	Definition	Ref. No.
Trowell (1972)	Dietary fiber is the remnants of the plants cell walls which are not hydrolyzed by digestive enzymes of man.	6
Trowell HC et al. (1976)	Dietary fiber consists of the plant polysaccharides and lignin which are resistant to hydrolysis by digestive enzymes of man.	29
Kiriyama S (1980)	Dietary fiber is all dietary ingredients that are not digested by digestive enzymes in humans.	30
New Zealand Food Regulations (1984)	Dietary fiber consists of edible plant components which are resistant to hydrolysis by endogenous enzymes of intestinal tract of human and is determined by AOAC method 985.29 (Prosky et al. 1985).	31
WHO/FAO (1985)	Dietary fiber is easily determined by consensus method and regarded as the constituents of edible animal and plant food being resistant to hydrolysis by proper enzyme in the gastrointestinal tract.	32
Prosky et al. (1985)	Besides dietary fiber categorized by Trowell et al. (1976), resistant starch and other substances resistant to digestion during food processing are included in the applicable range of AOAC-Prosky method.	27
Health and Welfare Canada (1985)	Dietary fiber is the endogenous compounds of plant material in the diet which are resistant to digestion by enzymes produced by humans. They are predominantly non-starch polysaccharides and lignin and may include, in addition, associated substances.	33
FDA (1987)	Dietary fiber is material determined by AOAC method 985.29.	28
FDA (1987)	Dietary fiber is final residues of plant substances in foods resistant to hydrolysis by human digestive enzyme.	34
Life Sciences Research Office (1987)	Dietary fiber is the endogenous components of plants materials in the diet which are resistant to digestion by enzymes produced by humans.	35
Englyst HN and Cummings TH (1988)	Dietary fiber may be defined as non-starch polysaccharides in plant food. Lignin is not a carbohydrate and should not be measured analytically with NSP as dietary fiber. Lignin is quantitatively a minor component in the human diet and is difficult to determine.	20
AACC (2001)	Dietary fiber is the edible parts of plants or analogous carbohydrates that are resistant to digestion and absorption in the human small intestine with complete or partial fermentation in the large intestine. Dietary fiber includes polysaccharides, oligosaccharides, lignin, and associated plant substances. Dietary fiber promotes beneficial physiological effects including laxation, and/or blood cholesterol attenuation, and/or blood glucose attenuation.	9
The Japanese Association for Dietary Fiber Research (2003)	The “luminacoids” was designed, as a comprehensive term that covers all such components, including dietary fiber in the conventional meaning. This comprehensive terminology should be classified into starch and non-starch components. Dietary fiber is a major component of non-starch substances and can be sub-classified into polysaccharides and lignin. Thus, the definition of “luminacoids” is proposed as follows: “dietary components which are not digested and/or absorbed in the human small intestine and which exert physiological effect that are useful in maintaining good health via the gastrointestinal tract”.	36

Table 2 Digestibility, composition of monosaccharide and glucosidic bond of test materials

	Digestibility	Composition of monosaccharide	Glycosidic bond
Nondigestible oligosaccharide			
FOS	Unhydrolyzed⁸⁷⁾	Glucose, Fructose	β-2,1 and α-1,2
GOS	Unhydrolyzed⁸⁸⁾	Glucose, Galactose	β-1,4
Raffinose	Unhydrolyzed⁸⁹⁾	Glucose, Fructose, Galactose	α-1,6 and α-1,2
Polymeric digestible saccharide			
Sucrose	Hydrolyzed⁹⁰⁾	Glucose, fructose	α-1,2
Palatinose	Hydrolyzed⁹¹⁾	Glucose, fructose	α-1,6
Coupling sugar ®	Hydrolyzed^{92,93)}	Glucose, fructose	α-1,2 and α-1,4
Monomeric digestible saccharide			
Maltotriose	Hydrolyzed⁹⁴⁾	Glucose	α-1,4
Panose	Hydrolyzed⁹⁵⁾	Glucose	α-1,4 and α-1,6
IMO	Hydrolyzed^{57,96)}	Glucose	α-1,4 and α-1,6

FOS, fructooligosaccharide; GOS, galactooligosaccharide; IMO, isomaltooligosaccharide.

Table 3 Ratio of the enzyme mixture solution of amyloglucosidase and pancreatic α -amylase

	AMG (U/mL)	Pancreatic α -amylase (U/mL)
Specified dose in AOAC 2009.01 method	3.4	50
2-fold	6.8	50
4-fold	13.6	50
10-fold	34.0	50

AMG, amyloglucosidase

Table 4 Ratio of the enzyme mixture solution of porcine small intestinal BBMV and pancreatic α -amylase

	Porcine small intestinal BBMV (U/mL)	Pancreatic α-amylase (U/mL)
Specified dose in AOAC 2009.01 method (1-fold)	3.4	50
2-fold	6.8	50
4-fold	13.6	50
10-fold	34.0	50
40-fold	136	50
200-fold	680	50
400-fold	1360	50
600-fold	2040	50
800-fold	2720	50
1000-fold	3400	50
1200-fold	4080	50

Table 5 Nutrient composition and ingredients of carbohydrates of the processed foods

	Energy (kcal)	Protein (g)	Fat (g)	Carbohydrate (g)	NDO* (g)
Syrup containing FOS (/100g)	207	0.0	0.0	72.5	40.0
Syrup containing GOS (/100g)	276	0.0	0.0	73.9	44.4
Black vinegar containing GOS (/100mL)	247	0.5	0.0	64.8	17.0
Carbonated drink containing GOS (/100mL)	20	0.0	0.0	5.5	2.5
Syrup containing Raffinose (/100g)	282	0.0	0.0	78.0	9.4
Syrup containing IMO (/100g)	300	0.0	0.0	75.0	≥ 63.0
Carbonated drink containing IMO (/100g)	130	1.3	0.0	30.7	19.0

NDO, nondigestible oligosaccharide; FOS, fructooligosaccharide; GOS, galactooligosaccharide; IMO, isomaltooligosaccharide.

Table 6 Recovery rate of nondigestible low-molecular weight fraction of test material by the AOAC 2001.03 method

	Nondigestible low-molecular weight fraction (%)
Dietary fiber	
RMD	93.8
Non-digestible oligosaccharide	
FOS	98.0
Digestible oligosaccharide	
IMO	67.3
Sucrose	90.8
Lactose	94.7

Analytical values were expressed as the mean of duplicated data. Nondigestible low-molecular weight fraction is from DP 2 to DP 13 of intact saccharide. RMD, resistant maltodextrin; FOS, fructooligosaccharide; IMO, isomaltooligosaccharide.

Table 7 Comparison of disaccharidase activities and ratio of disaccharidase versus sucrase activity between porcine and human

	<u>Human intestinal homogenate</u>		<u>Porcine intestinal homogenate</u>		Relative activity (Human/porcine)
	S.A.	Ratio to sucrase	S.A.	Ratio to sucrase	
Sucrase	12.9	1.0	5.1	1.0	2.5
Maltase	43.5	3.4	12.2	2.4	3.6
Trehalase	5.2	0.4	2.7	0.5	1.9
Lactase	1.7	0.1	2.2	0.4	0.8
Palatinase	4.7	0.4	1.6	0.3	2.9
Isomaltase	9.1	0.7	3.3	0.6	2.8

Data were expressed as the mean of duplicated data.

S.A.: specific activity (μ moles of substrate hydrolyzed/mg protein/h)

Table 8 Comparison of nondigestible fraction of oligosaccharide between porcine and human intestinal disaccharidases

	Nondigestible fraction (%)	
	Porcine	Human
Sucrose	75.2	46.2
IMO	78.8	66.2
FOS	98.4	97.7
RMD	94.6	95.1
GS	94.8	97.0
Lactulose	98.4	99.3
GOS	99.2	99.2
Cellobiose	98.7	99.8

Analytical values were expressed as the mean of duplicated data. Nondigestible fraction is DP 2 or more of intact oligosaccharide. IMO, isomaltooligosaccharide; FOS, fructooligosaccharide; RMD, resistant maltodextrin; GS, galactosylsucrose; GOS, galactooligosaccharide.

Table 9 Recovery rate of nondigestible fraction of test material by the AOAC 2009.01 method

	Non-digestible fraction (%)
Nondigestible oligosaccharide	
FOS	99.3
GOS	98.4
Raffinose	99.2
Polymeric digestible saccharide	
Sucrose	99.7
Palatinose	100.9
Coupling sugar ®	30.9
Monomeric digestible saccharide	
Maltotriose	2.0
Panose	30.3
IMO	78.8

Analytical values were expressed as the mean of duplicated data. Nondigestible fraction is DP 2 or more of intact oligosaccharide. FOS, fructooligosaccharide; GOS, galactooligosaccharide; IMO, isomaltooligosaccharide.

Table 10 Intra-laboratory repeatability of the improved modified method for determination of 1-kestose

Trial	Recovery (%)
1 st	97.2
2 nd	98.3
3 rd	98.1
4 th	97.5
5 th	101.0
Average (%)	98.4
RSD (%)	1.5

**Nondigestible fraction (Recovery) is DP 2 or more of intact oligosaccharide.
RSD is relative standard deviation, S.D./Average × 100.**

Table 11 Determination of nondigestible oligosaccharide by the improved modified method and AOAC 2009.01 method for test products

Added oligosaccharide	Recovery (%)		Contents of added oligosaccharide (g/100g)
	AOAC 2009.01 method	Improved modified method	
FOS	14.2	10.1	10
GOS	13.8	10.7	10
Raffinose	12.6	9.7	10
IMO	4.0	0.1	10
Sucrose	15.3	0.1	10

Analytical values were expressed as the mean of duplicated data. Nondigestible fraction (Recovery) is DP 2 or more. FOS, fructooligosaccharide; GOS, galactooligosaccharide; IMO, isomaltooligosaccharide.

Table 12 Analysis for non-igestible oligosaccharide in processed food samples by the improved modified method and comparison with value on nutritional label

Processed food samples	Oligosacchaeide on ingredient panel	Classification of processed food	Nondigestible oligosaccharide value/ (g/100g)	
			Analytical value	Labeled value
Syrup	FOS	Food for specified health use	41.2±1.8	40
Syrup	GOS	Food for specified health use	37.2±2.5 ^a	44.4
Black vineger	GOS	Food for specified health use	10.4±1.3 ^b	17
Carbonated drink	GOS	Food for specified health use	3.7±1.5 ^c	2.5
Syrup	Raffinose	Health food	9.6±0.5	9.4
Syrup	IMO	Food for specified health use	3.2±2.0 ^d	>63
Lactobaccillus beverage	IMO	Food for specified health use	N.D. ^e	19.0

Analytical values were expressed as mean ± SD (n=5). Nondigestible fraction is DP 2 or more. FOS, fructooligosaccharide; GOS, galactooligosaccharide; IMO, isomaltooligosaccharide. N.D., not detected. a-e: There were significant differences between analytical value and labeled value, respectively, at $p < 0.05$, by one sample *t*-test.

Table 13 Intra-laboratory repeatability of the improved modified method for determination of non-digestible oligosaccharide in processed food samples

Syrup containing FOS		Syrup containing GOS	
Trial	Amount (g/100g)	Trial	Amount (g/100g)
1 st	42.1	1 st	42.0
2 nd	43.8	2 nd	36.1
3 rd	41.4	3 rd	35.6
4 th	39.6	4 th	36.9
5 th	38.9	5 th	35.5
Average (g/100g)	41.2	Average (g/100g)	37.2
RSD (%)	4.3	RSD (%)	6.7
Black vinegar containing GOS		Carbonated drink containing GOS	
Trial	Amount (g/100g)	Trial	Amount (g/100g)
1 st	12.8	1 st	2.1
2 nd	9.2	2 nd	5.2
3 rd	9.6	3 rd	2.0
4 th	10.0	4 th	5.7
5 th	10.4	5 th	3.6
Average (g/100g)	10.4	Average (g/100g)	3.7
RSD (%)	12.5	RSD (%)	40.5
Syrup containing Raffinose		Syrup containing IMO	
Trial	Amount (g/100g)	Trial	Amount (g/100g)
1 st	9.9	1 st	5.4
2 nd	9.9	2 nd	1.7
3 rd	9.0	3 rd	1.6
4 th	10.1	4 th	5.9
5 th	8.9	5 th	1.7
Average (g/100g)	9.6	Average (g/100g)	3.2
RSD (%)	5.2	RSD (%)	62.5
Carbonated drink containing IMO			
Trial	Amount (g/100g)		
1 st	N.D.		
2 nd	N.D.		
3 rd	N.D.		
4 th	N.D.		
5 th	N.D.		
Average (g/100g)	0		
RSD (%)	0		

Nondigestible fraction (Amount) is DP 2 or more of intact oligosaccharide.
RSD is relative standard deviation, S.D./Average × 100. N.D. is not detected.