

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	NUNTANUT POPUANG
論文題目	Studies on the Biological Functionality of Cellulose Nanofiber and Its Derivative as Possible Food Additives （食品添加物として可能なセルロースおよびその誘導体ナノファイバーの生物学的機能性に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
今世紀に入り、食料の生産と確保、食材の機能性向上、環境への負荷低減を同時に実現する持続可能な食システムの構築が必要とされてきている。地球上で最も豊富なバイオマスであるセルロースは食品中の食物繊維の代表である。セルロースからは、いくつかのセルロース誘導体が開発され、カルボキシメチルセルロース（CMC）をはじめとする食品添加物が使用されている。セルロースナノファイバー（CNF）は、粉碎装置を用いた物理的解繊や2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシラジカル触媒を用いた化学的処理によって調製することができる。CNFは、その幅がナノ領域（$< 100\text{ nm}$）である高いアスペクト比をもち、高い保水性や粘度、高い乳化安定性を示すことから、従来の増粘剤や乳化安定剤に代わる新しい食品添加物として期待できる。しかし、従来の食品添加物であるCMCを大量に摂取すると、大腸炎や生活習慣病などの炎症を誘発する可能性があるとの研究報告もあり、新規化合物を食品へ利用するには安全性と生体適合性の検証が急務である。また、CNFはゾル状態で高機能性を発揮するが、食品添加物には乾燥状態で利用するものも多い。そこで、本論文では、食品添加物としてのセルロースおよびその誘導体ナノファイバーの生体適合性と優れた保存形態について検討している。 第1章では、トレハロース存在下でのCNF懸濁液の脱水・再水和過程が、CNFの機能性に与える影響について調べている。脱水は多くの生体高分子の凝集を引き起こし、その物理化学的・生物学的特性の喪失につながる。トレハロース二水和物をCNF懸濁液に添加し、熱風乾燥または凍結乾燥を行った。熱風乾燥では、乾燥後の再懸濁液はわずかに褐色を帯びていた。レーザー回折法による粒度分布や粘度計による流動特性の解析の結果、熱風乾燥では、トレハロースの濃度が70 wt%と高くてもCNFの元の構造を保持することはできなかったが、凍結乾燥では、トレハロース濃度が3 wt%と低くても、CNFの元の構造を保持できることを明らかにした。 第2章では、CNFとその誘導体の生体適合性を調べている。C57BL/6マウスを用いて、CNFおよびカルボキシメチルセルロースナノファイバー（CMCNF）を通常の脂肪含有（16 kcal%）食に混餌したときの生体適合性を、血中や糞便中の炎症性パラメーター、腸間膜リンパ節（MLN）における免疫細胞の変化や大腸の組織観察を指標に解析した。その結果、血中の腫瘍壊死因子α濃度、糞便中のリポカリン濃度、大腸組織のミエロペルオキシダーゼ活性などの炎症性パラメーターは、デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルマウスと比較して有意な増加は観察されなかった。大腸の組織学的観察では、ナノファイバー投与群で陰窩の深長が有意に大きくなったが、杯細胞数の減少は認められなかった。また、MLNにおける制御性T細胞やTh17細胞の割合に有意な変化は認められず、ナノファイバーが腸管免疫のホメオスタシスに悪影響			

を及ぼさないことが示された。さらに、腸内環境への影響については、ナノファイバー投与群で有意な盲腸内容物の重量増加が観察され、腸内細菌叢のFirmicutes門とBacteroidetes門の比率（F/B比）が有意に低下した。同時に、盲腸内の短鎖脂肪酸（SCFA）、特にプロピオン酸の産生が増加する傾向が見られた。これらの結果は、CNFおよびCMCNFがマウスの消化管に対して生体適合性があり、それらが新しい食品素材として利用できる可能性を示唆した。

第3章では、高脂肪（45 kcal%）・高ショ糖（35 kcal%）食におけるナノファイバー摂取の影響について解析している。 α -セルロース（aC）、未解繊CMC、CMCNFと一般に食品添加物として使用されている可溶性CMCの影響をC57BL/6マウスを用いて比較した。その結果、CMCNFと可溶性CMCの投与は、ともにマウスの体重増加と脂肪蓄積を抑制した。また、両投与群では、腸内細菌叢の組成が大きく変化し、F/B比をはじめ、肥満や炎症に関連する*Oscillospira*属や*Mucispirillum*属などの細菌群の存在量が有意に減少した。さらに、SCFAとしての酢酸の濃度が上昇する傾向がみられ、腸内発酵が亢進していることが示された。

第4章では、第2章・第3章と異なる系統のBALB/cマウスを用いて、高脂肪高ショ糖食におけるナノファイバー摂取の影響について解析している。aC、CNFの一例としてのバクテリアセルロース（BC）、未解繊CMC、CMCNFと可溶性CMCの生物学的効果を調べた。BALB/cマウスでは、可溶性CMC投与群において10匹中3匹のマウスが死亡し、炎症を示唆する水様便などの副作用が観察された。この群においては血中と肝臓組織中の低密度リポタンパク質コレステロール値が上昇しており、脂質代謝の障害が示唆された。糞便中のリポカリン量の増加はこの群における炎症反応を裏付けた。逆に、BCやCMCNFの投与群では、体重増加が抑制され、脂肪組織の重量が有意に減少し、経口グルコース負荷試験において血糖値の上昇が抑えられた。また、腸内細菌叢の組成を比較すると、可溶性CMC投与群では*Akkermansia*属が独占的に優勢となる一方で、BCやCMCNFの投与群では抗炎症性細菌である*Alloprevotella*属の増加が顕著であった。主座標分析により、添加した食物繊維の太さに基づいて明確なクラスタリングが観察されたことから、食物繊維の形態が細菌叢の組成に大きく影響することが明らかとなった。同時に、ナノファイバー摂取は腸内発酵を活性化し、酢酸とプロピオン酸の産生を促進した。さらに、糞便中の総胆汁酸レベルがBC投与群では有意に増加し、CMCNF投与群では増加傾向を示したことから、ナノファイバー摂取はコレステロール代謝における腸肝循環を変化させることが示された。

以上の知見は、セルロースおよびその誘導体ナノファイバーは消化管に対して十分に生体適合性を示すものであり、現在使用されているCMCと比べて、BCやCMCNFのナノファイバー素材は安全性の高い食品添加物として利用可能であることを示唆している。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

セルロースナノファイバー (CNF) は、その幅がナノ領域 (<100 nm) である高いアスペクト比をもち、高い保水性や粘度、高い乳化安定性を示すことから、従来の増粘剤や乳化安定剤に代わる新しい食品添加物として期待できる。しかし、従来の食品添加物であるCMCを大量に摂取すると、大腸炎や生活習慣病などの炎症を誘発する可能性があるとの研究報告もあり、新規化合物を食品へ利用するには安全性と生体適合性の検証が急務である。また、CNFはゾル状態で高機能性を発揮するが、食品添加物には乾燥状態で利用するものも多い。そこで、本論文では、食品添加物としてのセルロースおよびその誘導体ナノファイバーの生体適合性と優れた保存形態について検討している。評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. トレハロース存在下においてCNFを凍結乾燥させることは、元の構造である微細なナノファイバーネットワークを維持しながらCNFの脱水と再水和を促進する有望な方法であることを明らかにした。

2. ナノファイバーを混餌した通常の脂肪含有 (16 kcal%) 食をC57BL/6マウスに8週間与えたとき、栄養学的、免疫学的、病理組織学的な観点から、CNFおよびCMCNFの摂取は、消化管環境を変化させるものの生体適合性があり、それらが新しい食品素材として利用できる可能性を指摘した。

3. 高脂肪高ショ糖食におけるナノファイバー摂取の影響についてC57BL/6マウスを用いて解析したところ、CMCNFまたは可溶性CMCの摂取が、体重増加や脂肪蓄積を有意に減少させ、腸内細菌叢を大きく変化させることを明らかにした。

4. 高脂肪高ショ糖食におけるナノファイバー摂取の影響についてBALB/cマウスを用いて解析したところ、可溶性CMCの摂取は炎症を誘発する副作用が見られたものの、BCやCMCNFの摂取は腸内細菌叢を変化させ、耐糖能の脆弱性を改善することに寄与することを明らかにした。

以上のように、本論文は、セルロースおよびその誘導体のナノファイバーは消化管に対して十分な生体適合性を示すものであり、従来の食品添加物より安全で健康を改善することが期待できる素材として有用であることを明らかにしており、農産製造学、食品化学、腸内細菌学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和6年7月25日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)