ラットの糞便排泄に及ぼすハイアミロース コーンスターチ摂取の影響

笠岡 誠一^{*1}, 森田 達也¹, 猪飼 利圭¹,
大橋 晃¹, 桐山 修八²

Effect of High-amylose Cornstarch on Fecal Excretion in Rats

Seiichi Kasaoka,^{*1} Tatsuya Morita,¹ Michiyoshi Ikai,¹ Akira Oh-hashii,¹
and Shuhachi Kiriya²

J Jpn Soc Nutr Food Sci 52: 263-270 (1999)

The effects of high-amylose cornstarch (HAS) on fecal variables were examined in rats fed diets with graded levels of HAS (2.5-40%). Fecal number, weight, volume, and moisture content were significantly higher in rats fed the 20% and 40% HAS diets than in those fed the cornstarch (CS) diet. Cecal contents were significantly greater in rats fed dietary HAS at a level of 5% or above, but fecal starch excretion was greater only in rats fed the 10%, 20% and 40% HAS diets. The gastrointestinal transit time tended to be shorter in the HAS diet-fed groups. In a separate experiment, higher fecal excretion of nitrogen ($p<0.05$) and 2,6-diaminopimelic acid ($p=0.098$) was observed in rats fed the 20% HAS diet, compared with those fed the CS diet. A further experiment showed a greater cecal pool size of total short-chain fatty acids (SCFA) in rats fed the HAS diets (5-20%) than in those fed the CS diet. However, in rats fed the 20% HAS diet, the cecal pool size of succinate was found to exceed that of total SCFA. These results suggest that HAS moderately increases fecal output, probably by increasing the moisture content of the large bowel.

Key Words high-amylose cornstarch, fecal weight, cecal succinate, 2,6-diaminopimelic acid, rat.
(Received February 1, 1999; Accepted April 12, 1999)

食物繊維による糞便重量の増加および排便促進効果については多くの報告¹⁻³⁾があるが、小麦フスマなど大腸内で比較的分解(発酵)を受けにくい食物繊維は、それ自体が大腸内容物のカサを増加させるとともに、未発酵の繊維が水分を保持することで、さらに大腸内容物を増加させると考えられている¹⁾。一方、発酵を受けやすい食物繊維においても糞便重量の増加は認められている²⁾。Stephen & Cummings²⁾は、食物繊維が発酵を受け腸内細菌の増殖を促進し、その結果菌体重量が増加することで糞便量は増加すると報告している。このような大腸内容物量の増大(カサの増大)は排便反射を促し排

便を促進すると考えられるが、近年、大腸内での発酵産物である短鎖脂肪酸(SCFA)の大腸機能に対する役割が明らかにされつつある。すなわち、Yajima⁴⁾はSCFAが大腸組織の蠕動運動を刺激することをラットの摘出大腸組織で認めており、発酵によって生成したSCFAは排便を促進する可能性がある。したがって、食物繊維による排便促進効果は、食物繊維自体による、また菌体の増加によるカサの増大に加え、SCFAの作用によって発現すると推測されている。

ところで、大腸内に流入する炭水化物は食物繊維に限らない。デンプンは、摂取したすべてが小腸内で消化、

* 連絡・別刷請求先 (Corresponding author)

¹ 山之内製薬株式会社コンシューマー製品研究所 (174-8612 東京都板橋区蓮根 3-17-1)
Institute for Consumer Healthcare, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Hasune 3-17-1, Itabashi-ku, Tokyo 174-8612, Japan

² 大妻女子大学栄養化学研究室 (102-8357 東京都千代田区三番町 12 番地)
Laboratory of Nutritional Biochemistry, Otsuma Women's University, Sanban-cho 12, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8357, Japan

吸収されるわけではなく、一部が大腸内に流入する⁵⁾。このような消化抵抗性を示すデンプンは、レジスタントスターチ (RS) と呼ばれ、現在では、「健康なヒトの小腸内で消化吸収されないデンプンおよびデンプンの部分分解物の総称」と定義されている⁶⁾。ハイアミロースコーンスターチ (HAS) は、天然のデンプン粒で結晶構造上の性質から消化抵抗性を示すタイプ2のRS⁷⁾であるが、われわれはこれまでHASの栄養・生理的意義の検索を行ってきた⁸⁻¹⁵⁾。先の報告¹¹⁾では回-直腸吻合および正常ラットを用い、HASの小腸内消化率および大腸内での分解率について検討した結果、HASの小腸内消化率は通常のコーンスターチ (CS) の100%に比べて低く、67-74%に留まり、また大腸内での分解率は総HAS摂取量の16-25%であることを明らかにした。したがって、大腸内に流入したHASは腸内容物のカサを増加させるとともに、発酵を受け腸内細菌の増殖を促進し、一方、HASの大腸内発酵により生成したSCFAは排便を促進する可能性がある。

Scheppach *et al.*¹⁶⁾は、健康人に高デンプン食を摂取させた(対照期)後、さらにアミログルコシダーゼ阻害剤を摂取させ強制的に大腸内へのデンプン流入量を増加させた(試験期)結果、試験期の糞便量は対照期に比べ有意に増加し、試験期の糞中菌体排泄量は対照期に比べ有意に高い値を示したと報告している。一方、RS含量を高めた食事を用いた試験では、RSが糞便量を増加させるとする報告¹⁷⁾と増加させないとする報告¹⁸⁾があるが、この原因としては被験者の腸内細菌叢、RS摂取量および摂取期間ならびにRS供給源(RSのタイプ)の違いが関与していると考えられる。

そこで、本試験ではタイプ2のRSであるHASの排便促進効果の程度を明らかにする目的で、ラットを用いHAS摂取時の大腸内容物量(糞便量)と盲腸内SCFAの生成量について検討した。まず、実験1では、HASの糞便量に対する影響を詳細に検討するため、比較的高用量(飼料中40%)までのHASを段階的に添加した飼料をラットに摂取させ、糞便の個数、湿重量、乾燥重量および水分含量を測定した。また、糞便体積ならびに摂取した飼料の消化管内通過時間の測定を行った。次に、実験2では、HASの発酵性について検討するため、HAS摂取時の盲腸重量、盲腸内SCFA量ならびに糞中スターチを測定した。さらに、実験3では、HAS摂取時の糞中窒素およびジアミノピメリン酸排泄量を測定することで、糞便重量に与える腸内細菌の増殖(菌体重量)の影響についても検討した。これらの結果を併せHASの糞便量および排便促進に及ぼす影響について考察する。

実験方法

1. 実験材料

実験に用いたHAS (Hi-maize®) は Starch Aus-

Table 1 Composition of basal diets. (g/kg)

Ingredients	SU	CS
Sucrose (SU)	655	—
Cornstarch (CS)	—	655
Casein	250	250
Corn oil	50	50
Mineral mixture ¹	35	35
Vitamin mixture ¹	10	10

¹Based on AIN-76²¹⁾.

tralasia 社 (Lane Cove, Australia) から供与されたもので、ヨウ素比色法¹⁹⁾で測定したアミロース含量は83%、Prosky 法²⁰⁾によって求めた総食物繊維含量は23%であった。

2. 実験動物

実験には3週齢(実験1)または6週齢(実験2および3)のSD系雄ラットを用い、ラットは室温23±1°C、相対湿度60-70%、12時間の明暗周期(8:00に点灯)の条件下、ステンレス製ケージ内で個別飼育した。ラットは搬入後、少なくとも7日間は糖質源のすべてをスクロース (SU) (実験1) またはコーンスターチ (CS) (実験2および3) とした飼料(それぞれSUおよびCS飼料)を与え馴化した後、実験に供した。SUおよびCS飼料の組成²¹⁾はTable 1に示した。なお、すべての動物実験は、山之内製薬(株)動物実験管理委員会において定められた「動物実験に関する指針」に則って実施した。

実験1: 3週齢雄ラットをSU飼料で馴化した後、体重を基準に4群に分け、糖質源として飼料中に60%のCSと5.5%のSUを含むCS飼料、またはCS飼料中のCSと置き換えることによって10%、20%および40%のHASを添加した飼料(10-40% HAS飼料)のいずれかを、水道水とともに自由摂取させた。なお、本試験ではラットのHAS摂取に対する適応を観察するため、飼育期間は4週間とした。飼育期間中、体重および飼料摂取量は2日ごとに記録した。飼育開始後1、2および3週目の最後の3日間は12時間間隔(9:00と21:00)で糞便を採取し、糞便の個数および湿重量を測定した。糞便の体積は、実験開始後16日目に採取した糞便を用い、一定量の流動パラフィン中に浸漬することによって増加する体積として求めた。また、8日目には摂取した飼料の消化管内通過時間を測定する目的で、生理食塩水に懸濁した2%カルミン懸濁液をラットに体重1kg当たり5mL、胃内へ経口的に投与した。投与後10-48時間にわたり糞便を観察し、糞便中にカルミン(赤色物)が排泄された最初の時間を記録した。なお、カルミン懸濁液は19:00-20:00の時間帯(暗期に入る1時間前)に投与した。飼育終了後、エーテル麻酔下で放血により致死せしめ、この後盲腸を摘出し内容物および組織重量を測定した。

実験2: 6週齢雄ラットをCS飼料で馴化した後、体重を基準に5群に分け、糖質源として65.5%のCSを含むCS飼料、または2.5%, 5%, 10%および20%のHASを添加した飼料(2.5-20% HAS飼料)のいずれかを、16日間にわたり水道水とともに自由摂取させた。HASはCSと置き換えることで添加した。飼育期間中、体重および飼料摂取量は2日ごとに記録した。飼育終了後、エーテル麻酔下で放血により致死せしめ、この後盲腸を摘出し内容物および組織重量を測定した。盲腸内容物はpHおよびアンモニアの測定に供した。また、盲腸内容物の一部は有機酸の測定時まで -20°C で保存した。糞便は試験終了直前の3日間に採取し凍結乾燥した後、スターチおよび窒素の測定に供した。

実験3: 6週齢雄ラットをCS飼料で馴化した後、体重を基準に2群に分け、糖質源として65.5%のCSを含むCS飼料、または20%のHASを添加した飼料(20% HAS飼料)のいずれかを、10日間にわたり水道水とともに自由摂取させた。HASはCSと置き換えることで添加した。飼育期間中、体重および飼料摂取量は2日ごとに記録した。糞便は、試験終了直前の3日間に採取し凍結乾燥した後、スターチ、窒素およびジアミノピメリン酸の測定に供した。飼育終了後、エーテル麻酔下で放血により致死せしめ、この後盲腸を摘出し内容物および組織重量を測定した。

3. 測定項目および測定方法

3.1 盲腸内容物のpH、アンモニアおよび有機酸の測定 盲腸内容物のpHは300 mg前後を攪拌後、同重量の蒸留水を加え均一化した後、pHメーター(Model C-1, 堀場, 東京)にて測定した。

盲腸内容物中のアンモニアは、奥田・藤井の方法²²⁾に従い測定した。すなわち、50 mgの盲腸内容物に0.0625 M 硫酸を含む1.25%タングステン酸ナトリウム溶液4 mLを加え攪拌後、遠心操作により上清を得た。上清中のアンモニアは市販キット(アンモニア-テストワコー, 和光純薬工業, 大阪)を用いて測定した。

盲腸内容物中の有機酸は、Hoshi *et al.*の方法²³⁾に従い、Shim-pack SCR-102 H カラム(30 cm, i.d., 8 mm, 島津製作所, 京都)および電気伝導度検出器(CDD-6 A, 島津製作所, 京都)を装着したHPLC(LC-6 A, 島津製作所, 京都)を用い、内部標準法によって測定した。すなわち、300 mgの盲腸内容物を0.7 mLの蒸留水で懸濁し、さらに0.3 mg/mLのクロトン酸(内部標準)を含む10 mM 水酸化ナトリウム溶液1 mLを加え均一化した後、 $10,000\times g$ で15分間遠心し上清を得た。この上清1 mLにクロロホルム1 mLを加え、十分混和し、さらに遠心分離によって得られた水層3 μL を分析に供した。

3.2 糞中スターチ、窒素およびジアミノピメリン酸の測定 糞中スターチの測定は、Morita *et al.*の方法¹³⁾に従い行った。すなわち、凍結乾燥糞便100 mgに0.2

mLの80%エタノールを加え膨潤後、2 mLのジメチルスルホキシドを加え、 100°C 、30分間加温することにより糞中スターチを完全に可溶化させた。可溶化したスターチは市販キット(Total starch assay kit, Megazyme, Australia)を用い測定した。糞中窒素はKjeldahl法²⁴⁾に従い測定した。糞中ジアミノピメリン酸はCzerkawskiの方法²⁵⁾に従い、凍結乾燥糞便に20%塩酸を加え、 105°C 、16時間加水分解した後、アミノ酸自動分析計(835型, 日立製作所)にて測定した。

4. 統計解析

実験結果は、各実験群の平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。各データの統計処理は分散分析を行った後、 $p<0.05$ の場合はDuncanの多重比較検定法²⁶⁾で検定した。Bartlett検定²⁷⁾により分散が均一でない場合には、データを対数変換した後に分散分析を行い、 $p<0.05$ の場合には多重比較検定を行った。また、データを対数変換した後も分散が均一でない場合には、不等分散分析(Kruskal-Wallis)を行い、 $p<0.05$ の場合にはKolmogorov-Smirnov two-sample検定²⁷⁾によって検定し、結果はメジアンおよび範囲で示した。なお、実験3では2群間の比較を行うため、Student's *t*検定法により検定した。

実験結果

実験1 試験期間中の飼料摂取量および体重増加量は群間で差がなかった(Table 2)。

CS飼料群の糞便個数は各週において群間で最も低い値を示した(Figure 1-A)。一方、HAS飼料群ではHASの添加量に応じて糞便個数は増加する傾向を示し、40% HAS飼料群の糞便個数はCS飼料群に比べ各週を通じて有意に高い値を示した。また、20% HAS飼料群も1週目を除きCS飼料群に比べ有意に高い値を示したが、10% HAS飼料群では各週ともCS飼料群と差がなかった。糞便湿重量も同様にCS飼料群で最も低い値を示し、20%および40% HAS飼料群では各週を通じてCS飼料群に比べ有意に高い値を示した(Figure 1-B)。10% HAS飼料群の糞便湿重量は各週を通じてCS飼料群と差がなかった。各試験群の糞便乾燥重量は湿重量の場合と全く同様の傾向を示した(Figure 1-C)。糞便の水分含量は各週ともCS飼料群で最も低い値を示し、20%および40% HAS飼料群ではCS飼料群に比べ1週目を除き有意に高い値を示した(Figure 1-D)。40% HAS飼料群の水分含量は、20% HAS飼料群に比べ2週目で有意に高い値を示したが、1および3週目では差がなかった。10% HAS飼料群とCS飼料群の水分含量に差はなかった。また本試験の結果から、ラットのHAS摂取への適応には2週間程度必要であると考えられた。

糞便体積はCS飼料群が群間で最も低い値を示し、10%, 20%および40% HAS飼料群ではCS飼料群に比べ有意に高い値を示した(Table 2)。40% HAS飼料

Table 2 Food intake, body weight gain, fecal volume and gastrointestinal transit time in rats fed the respective diets for 4 weeks (experiment 1).¹

	Diets			
	CS ²	10% HAS ³	20% HAS	40% HAS
Food intake (g/4 weeks)	464±10	465±17	459±14	450±22
Body weight gain (g/4 weeks)	176±6	175±8	179±7	170±10
Cecum				
tissue weight (g)	0.53±0.05 ^a	1.08±0.05 ^b	1.50±0.06 ^c	1.92±0.07 ^d
cecal contents (g) ⁴	1.87±0.09 ^a	7.59±0.06 ^b	9.37±0.59 ^b	13.88±1.68 ^c
Fecal volume (mL/day) ^{4,5}	0.30±0.03 ^a	0.48±0.03 ^b	0.67±0.12 ^b	2.02±0.30 ^c
Transit time (h) ⁶	13.7±1.8	10.8±0.3	<10	<10

¹Data are expressed as means±SEM (*n*=6) ; values in a row with different superscript letters are significantly different (*p*<0.05). Average initial body weight, 176 g (range ; 170 to 183 g). ²CS, cornstarch. ³HAS, high-amylose cornstarch. ⁴Data were transformed logarithmically before analysis. ⁵Feces were collected on day 16. Feces were put in a graduated cylinder filled with a defined volume of liquid paraffin, then the increased volume was measured. ⁶On day 8, a 2% suspension of carmine dye in 0.9% NaCl solution was given orally (5 mL/kg body weight) to each rat on 19 : 00-20 : 00 to serve as a fecal marker, and the first appearance of the red dye in the feces was recorded.

Figure 1 Fecal characteristics in rats fed the CS (□), 10% HAS (▨), 20% HAS (▩), and 40% HAS (■) diets for 4 weeks (experiment 1).

Each column is the mean of six rats ; vertical bars represent SEM. Column with no common letters are significantly different (*p*<0.05) when analyzed by Duncan's multiple range test. A, fecal number ; B, fecal wet weight ; C, fecal dry weight ; D, moisture in feces.

群の糞便体積はCS飼料群に比べおよそ6-7倍の高い値を示した。摂取した飼料の消化管内通過時間を測定するため、本試験ではカルミン懸濁液投与後10時間目から糞便の観察を開始したが、その時点ですでに10% HAS飼料では1匹、20%および40% HAS飼料群ではすべてのラット(6匹)でカルミン(赤色物)が糞中へ排泄されていた。このため、正確な消化管内通過時間が測定できず統計処理はできなかったが、HAS飼料の消化管

内通過時間はCS飼料群に比べ短縮する傾向が認められた。

CS飼料群の盲腸組織重量に比べ10%、20%および40% HAS飼料群では有意に高い値を示し、その程度は飼料中へのHASの添加量に依存していた(Table 2)。盲腸内容物重量についても、盲腸組織重量と同様の傾向が認められた。

実験2 20% HAS飼料群の飼料摂取量はCS飼料群

Table 3 Food intake, body weight gain, cecal variables and fecal excretion in rats fed the respective diets for 16 days (experiment 2).¹

	Diets				
	CS ²	2.5% HAS ³	5% HAS	10% HAS	20% HAS
Food intake (g/16 days)	307±6	307±9	289±13	298±9	274±5
Body weight gain (g/16 days)	95±2	95±4	84±6	96±5	84±2
Cecum					
tissue weight (g)	0.47±0.02 ^a	0.56±0.05 ^a	0.65±0.03 ^b	0.80±0.04 ^c	1.24±0.03 ^d
cecal contents (g) ⁴	2.24±0.17 ^a	2.63±0.22 ^a	3.31±0.12 ^b	5.05±0.28 ^c	8.71±0.50 ^d
pH ⁵	7.5 (7.4-7.7)	7.3 (6.8-7.6)	7.3 (6.4-7.5)	6.6** (5.8-7.3)	5.6** (5.6-5.9)
Organic acids (μmol/g cecal contents)					
acetate	34.4±2.7	33.4±1.8	33.7±2.7	33.2±4.9	28.4±2.9
propionate ⁴	13.6±0.8 ^a	13.6±0.8 ^a	13.3±0.5 ^a	16.8±1.9 ^{ab}	18.4±1.7 ^b
<i>n</i> -butyrate ⁴	5.2±0.5	6.4±0.7	5.3±0.6	7.5±2.1	4.5±0.9
SCFA ⁶	53.2±0.7	53.4±2.7	52.3±2.9	57.6±6.0	51.3±3.6
succinate ⁵	3.0 (1.4-5.8)	10.2 (1.5-41.5)	3.2 (1.6-62.0)	43.3 (0.9-80.4)	61.9** (41.2-78.9)
Organic acids (μmol/cecum)					
acetate	77.1±7.8 ^a	88.0±8.5 ^a	112.1±11.6 ^a	164.4±21.6 ^b	244.7±22.9 ^c
propionate ⁴	30.5±2.8 ^a	35.9±3.6 ^{ab}	43.8±1.8 ^b	86.7±13.5 ^c	163.7±22.5 ^d
<i>n</i> -butyrate ⁴	11.9±1.5 ^a	17.4±2.8 ^a	17.3±1.7 ^a	37.7±10.4 ^b	38.2±7.0 ^b
SCFA ^{4,6}	120±12 ^a	141±3 ^{ab}	173±13 ^b	289±29 ^c	447±38 ^d
succinate ⁵	7.9 (3.3-10.9)	24.9 (4.9-125.8)	10.1 (5.9-205.5)	241.3* (3.9-381.1)	508.2** (379.9-764.7)
Cecal ammonia (μmol/cecum) ⁴	41.0±4.4 ^a	49.3±6.6 ^a	55.4±3.7 ^{ab}	79.5±11.5 ^b	156.2±17.5 ^c
Fecal excretion ⁷					
dry matter (g/day)	0.54±0.02 ^a	0.57±0.03 ^a	0.61±0.05 ^{ab}	0.63±0.02 ^{ab}	0.69±0.03 ^b
starch (mg/day) ⁴	4.3±0.4 ^a	5.0±0.4 ^{ab}	5.9±0.7 ^{ab}	7.5±1.1 ^b	48.9±8.5 ^c

¹Data are expressed as means±SEM (*n*=6) ; values in a row with different superscript letters are significantly different (*p*<0.05). Average initial body weight, 220 g (range ; 208 to 237 g). ²CS, cornstarch. ³HAS, high-amylose cornstarch. ⁴Data were transformed logarithmically before analysis. ⁵Results are medians with range in parentheses. The effects of dietary treatment were examined by Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Kolmogorov-Smirnov two-sample tests. **p*<0.05 *vs.* CS diet ; ***p*<0.01 *vs.* CS diet. ⁶Sum of acetate+propionate+*n*-butyrate. ⁷Feces were collected for the last 3 days of the experimental period.

に比べやや低い値を示したが統計上有意な差は認められず、体重増加量も群間で差はなかった (Table 3)。

CS 飼料群の盲腸組織重量に比べ5%, 10%および20% HAS 飼料群では有意に高い値を示し、その程度は飼料中への HAS 添加量に依存していた (Table 3)。一方、2.5% HAS 飼料群の盲腸組織重量は CS 飼料群と差がなかった。盲腸内容物重量についても、盲腸組織重量と同様の傾向が認められた。CS 飼料群の盲腸内 pH は群間で最も高い値を示し、10%および20% HAS 飼料群では CS 飼料群に比べ有意に低い値を示した。

各飼料摂取時の主要な盲腸内有機酸として酢酸、プロピオン酸、酪酸およびコハク酸を測定したが、酢酸、酪酸および総 SCFA (酢酸、プロピオン酸および酪酸の合計) 濃度は群間で差がなかった (Table 3)。20% HAS 飼料群のプロピオン酸およびコハク酸濃度は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した。一方、プールサイズでは、すべての SCFA は飼料中への HAS 添加量に

応じて増加した。盲腸内酢酸量は CS 飼料群で最も低い値を示し、10%および20% HAS 飼料群の盲腸内酢酸量は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した。また、20% HAS 飼料群と 10% HAS 飼料群の盲腸内酢酸量にも有意な差が認められた。盲腸内プロピオン酸量も CS 飼料群で最も低い値を示し、5%, 10%および20% HAS 飼料群の盲腸内プロピオン酸量は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した。また、5-20% HAS 飼料群間の差異もすべて有意であった。CS 飼料群の盲腸内酪酸量は群間で最も低い値を示したが、CS 飼料群に比べ10%および20% HAS 飼料群では有意に高い値を示した。また、20% HAS 飼料群の盲腸内酪酸量は10% HAS 飼料群と同等であった。盲腸内コハク酸量は10%および20% HAS 飼料群において有意でかつ顕著な増加を示し、10% HAS 飼料群では CS 飼料群の約30倍、20% HAS 飼料群では約64倍の値を示した。

盲腸内アンモニア量は HAS 飼料群で増加し、10%お

よび 20% HAS 飼料群では CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した (Table 3)。20% HAS 飼料群と 10% HAS 飼料群の盲腸内アンモニア量にも有意な差が認められた。

20% HAS 飼料群の糞便乾燥重量は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した (Table 3)。CS 飼料群の糞中スターチ排泄量は群間で最も低い値を示したが、CS 飼料群の糞中スターチ排泄量に比べ 10% および 20% HAS 飼料群では有意に高い値を示した。20% HAS 飼料群の糞中スターチ排泄量は、10% HAS 飼料群に対しても有意に高い値を示し、10% HAS 飼料群の約 6.5 倍の値であった。

実験 3 20% HAS 飼料群の飼料摂取量は CS 飼料群に比べ有意に低い値を示したが、体重増加量は両群間で差がなかった (Table 4)。20% HAS 飼料群の盲腸組織および盲腸内容物重量は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した。糞便乾燥重量ならびに糞中スターチおよび糞中窒素排泄量において、20% HAS 飼料群は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した。また、本試験での 20% HAS 飼料群の糞中スターチ排泄量は、実験 2 の 20% HAS 飼料群で得られた値に比べ数倍高い値を示したが、従来の報告¹¹⁾¹³⁾の範囲内であった。20% HAS 飼料群の糞中ジアミノピメリン酸排泄量は CS 飼料群に比べ高くなる傾向 ($p=0.098$) を示した。また、糞中ジアミノピメリン酸と窒素排泄量には正の相関が認められた ($r=0.767$, $p<0.05$)。

Table 4 Food intake, body weight gain and fecal excretions of starch, nitrogen and 2,6-diaminopimelic acid in rats fed the respective diets for 10 days (experiment 3).¹

	Diets	
	CS ²	20% HAS ³
Food intake (g/10 days)	164±5	145±2*
Body weight gain (g/10 days)	59±5	55±3
Cecum		
tissue weight (g)	0.51±0.01	1.13±0.05*
cecal contents (g)	1.76±0.13	7.70±0.30*
Fecal excretion ⁴		
dry matter (g/day)	0.42±0.02	0.68±0.05*
starch (mg/day)	2.1±0.6	161.1±20.8*
nitrogen (mg/day)	23.1±0.6	31.9±2.2*
2,6-diaminopimelic acid (μmol/day)	1.40±0.13	1.75±0.15

¹Data are expressed as means±SEM ($n=6$). Average initial body weight, 175 g (range; 170 to 178 g). The effects of dietary treatment were examined by Student's *t*-test. * $p<0.05$. ²CS, cornstarch. ³HAS, high-amylose cornstarch. ⁴Feces were collected for the last 3 days of the experimental period.

考 察

本試験の結果から明らかなように、HAS は摂取量に応じて糞便個数、重量および体積を増加させるが、対照となる CS 飼料に比べ有意でかつ顕著な差を示したのは、20% HAS 飼料からであった (Figure 1 および Table 2)。また、実験 2 および 3 においても 20% HAS 飼料群の糞便乾燥重量 (0.69 g/day および 0.68 g/day) は、実験 1 の 20% HAS 飼料群 (0.53-0.66 g/day) とほぼ同様の値を示し、CS 飼料群に比べ有意に高い値を示すことが確認された。なお、実験 1 の飼料には糖質源の一部に 5.5% の SU が含まれていたが、糞便排泄量への影響は認められなかった。この HAS 摂取時の糞便排泄量の増加には、盲腸・大腸内容物量の増加、すなわち小腸を未消化で通過する HAS 量が関与すると考えられる。われわれは先の報告において¹¹⁾、摂取した HAS の 30% 前後は小腸を未消化で通過することを明らかにしているが、本試験 (実験 1 および 2) においても、HAS 飼料群の盲腸内容物重量は HAS 添加量に応じて増加していた (Table 2 および 3)。

しかしながら、盲腸内容物重量の増加は、必ずしも直接的に糞便重量に反映されるとは限らないようである。Andrieux *et al.*²⁸⁾ は、通常および無菌ラットに HAS を摂取させ、盲腸および糞中へのスターチ流入 (排泄) 量を測定しているが、このとき、盲腸内に流入するスターチ量はラットの種類に係わらず一定 (摂取量の約 40%) であったが、糞中へのスターチ排泄量は無菌ラットでは摂取量の約 30% であったのに対し、通常ラットでは 3% 程度であったことを報告している。本試験 (実験 2) においても、盲腸内容物重量は 5-20% HAS 飼料群で CS 飼料群に比べ有意な増加を示したが、糞中スターチ量に有意な増加が認められたのは 10-20% HAS 飼料群においてであった (Table 3)。すなわち発酵性の高い HAS は、腸内細菌によって種々の有機酸やガスへと積極的に変換されるため、盲腸内に流入した HAS それ自体による糞便重量の増大効果はかなり減弱すると考えられる。

一方、腸内細菌にとって良い発酵基質となる HAS は²⁹⁾、菌体の増殖を促すと考えられる。Stephen & Cummings²⁾ はキャベツ由来の食物繊維を 1 日当り 18 g ヒトに摂取させたときの糞便増加量およびその構成成分についての検討を行っているが、キャベツ繊維摂取時の糞便中乾物増加量の 50% 以上は菌体由来であることを報告している。かれらは、菌体の水分含量が 80% 程度であり菌体自体が保水能を持つと考えられることから、菌体の増殖は大腸内容物のカサを増し排便を促進すると結論づけている。またスターチについても菌体の増殖を示唆する報告がある。Remesy *et al.*³⁰⁾ は飼料中に 20-40% の生ポテトスターチ (HAS と同様にタイプ 2 の RS) を含む飼料をラットに与えたとき、菌体合成のた

め腸内細菌のタンパク質要求量が高まり、この際大量の尿素が血中から盲腸中に流入すると報告している。本試験(実験2)においても、HAS 飼料群の盲腸内アンモニア量は、HAS の添加量に応じて増加する傾向を示し、10 および 20% HAS 飼料群の盲腸内アンモニア量は、CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した (Table 3)。そこで実験3では、HAS 飼料摂取時の糞便増加効果における菌体増殖の関与について検討するため、糞便中の窒素ならびに細菌の細胞膜に特有の構成アミノ酸であるジアミノピメリン酸含量²⁵⁾を測定した。その結果、20% HAS 飼料群では、CS 飼料群に比べ窒素排泄量では有意に高い値を示したが、ジアミノピメリン酸排泄量は高くなる傾向 ($p=0.098$) を示すにとどまった。Caldarini *et al.*³¹⁾ は、pH と腸内細菌の増殖の関係について明らかにする目的で、ヒトの糞便を培養した結果、極度の pH の低下は *Bacteroides* などの大腸での主要な腸内細菌を減少させ、酸性耐性を示す乳酸菌のみを増殖させると報告している。Table 3 に示すように、本試験においてもラットに 20% HAS 飼料を摂取させたとき、盲腸内容物中には高濃度のコハク酸が蓄積し、盲腸内容物の pH は 5.6 にまで低下した。したがって、HAS は腸内細菌にとって良い発酵基質となる反面、極度の pH の低下を招き、この結果、一部の菌種を除き積極的な菌体増殖は得られなかったのかもしれない。

次に実験2で HAS 摂取時の盲腸内有機酸について検討したところ、CS 飼料群に比べ HAS 飼料群の酢酸および酪酸のプールサイズは 10-20% HAS 飼料群で、またプロピオン酸のプールサイズは 5-20% HAS 飼料群で有意に高くなった (Table 3)。しかし、これら SCFA の盲腸内濃度は、20% HAS 飼料群のプロピオン酸を除きほとんど変化していなかった。一方、HAS 摂取時には SCFA に加え多量のコハク酸が検出されたが、コハク酸はプールサイズのみならず、その濃度においても HAS 添加量に伴い増加し、10%および 20% HAS 飼料では CS 飼料群に比べ有意に高い値を示した。コハク酸は腸内細菌によって産生される通常の有機酸であるが³²⁾、乳酸と同様に吸収速度が遅く管腔内で蓄積しやすいと考えられている³³⁾。このため、多量のコハク酸は大腸管腔内に水分を引き込み下痢を誘発する可能性がある。Hoshi *et al.*²³⁾ は 10% のオリゴ糖 (キシロシルフルクトシド) を含む飼料をラットに摂取させた実験において盲腸内コハク酸濃度の顕著な増加とコハク酸濃度の増加によると思われる下痢を確認している。われわれは、6% のフラクトオリゴ糖を含む飼料をラットに摂取させた実験においても同様に、高濃度のコハク酸と軟便の発現を認めている¹⁵⁾。本試験(実験1)でも、20% および 40% HAS 飼料群の糞便の水分含量は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示し (Figure 1-D)、この 2 群の糞便は軟らかく、なかには糞塊が形成されないものも散見された。したがって、盲腸内有機酸パターンから考える限

り、20-40% HAS 飼料群で認められた糞便重量の増加 (Figure 1) および消化管内通過時間の短縮 (Table 2) は、SCFA による蠕動運動の刺激よりも、むしろコハク酸による影響が大きいと考えられる。

以上の結果をまとめると、ラットにおける HAS の糞便重量増加および排便促進効果はおだやかであり、比較的大量に摂取したときにのみ発現するものと考えられる。また、これらの効果は主に発酵によって生成したコハク酸による大腸内水分量の増大に基づくものであり、さらに菌体増加による大腸内容物のカサの増大も一部関与していると考えられた。今後はヒトにおける HAS の大腸内発酵パターンと大腸機能に及ぼす影響について、ラットでの結果と比較しつつ検討を行っていきたい。

要 約

本試験では HAS の糞便量および排便促進に及ぼす影響について検討した。その結果、HAS は摂取量に応じて糞便の個数、重量および体積を増加させたが、CS 飼料群に比べ有意な増加を示したのは 20% HAS 飼料からであった。5-20% HAS 飼料群の盲腸内容物重量は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示したが、糞中へのスターチ排泄量に有意な増加が認められたのは 10-20% HAS 飼料群においてであった。20% HAS 飼料群では CS 飼料群に比べ有意に高い糞便乾燥重量および糞中窒素排泄量を示し、糞中ジアミノピメリン酸排泄量も高くなる傾向が認められた。HAS 飼料群 (5-20%) の盲腸内総 SCFA 量は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示したが、20% HAS 飼料群では総 SCFA 量を越える量のコハク酸が検出された。20% HAS 飼料群の糞便中水分含量は CS 飼料群に比べ有意に高い値を示し、HAS 飼料群の消化管内通過時間は短縮する傾向を示した。以上の結果から、HAS の糞便重量増加および排便促進効果はおだやかであり、比較的大量に摂取したときにのみ発現するものと考えられる。また、これらの効果は主に発酵によって生成したコハク酸による大腸内水分量の増大に基づくものであり、さらに菌体増加による大腸内容物のカサの増大も一部関与していると考えられた。

文 献

- 1) Burkitt DP, Walker ARP, Painter NS (1974) Dietary fiber and disease. *J Am Med Assoc* **229** : 1068-74.
- 2) Stephen AM, Cummings JH (1980) Mechanism of action of dietary fiber in human colon. *Nature* **284** : 283-4.
- 3) Cummings JH (1984) Constipation, dietary fiber and the control of large bowel function. *Postgrad Med J* **60** : 811-9.
- 4) Yajima T (1985) Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J Physiol* **368** : 667-8.

- 5) Englyst HN, Cummings JH (1985) Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *Am J Clin Nutr* **42** : 778-87.
- 6) EURESTA (1991) *Euresta Neweslett* **11** : 1.
- 7) Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fraction. *Eur J Clin Nutr* **46** (Suppl. 2) : S33-50.
- 8) 森田達也, 大橋 晃, 猪飼利圭, 森岡 保, 桐山修八 (1996) レジスタントスターチの生理機能とその利用. *食品と開発* **31**, 34-38.
- 9) 桐山修八, 大橋 晃, 笠岡誠一, 猪飼利圭, 森田達也 (1996) レジスタントプロテインによるラット盲腸内の発酵制御. 必須アミノ酸研究 **146**, 19-26.
- 10) 森田達也, 桐山修八 (1996) “レジスタントプロテイン”の生理作用. 大腸内発酵を制御するタンパク質とペプチド. *化学と生物* **34**, 564-6.
- 11) 猪飼利圭, 笠岡誠一, 大橋 晃, 森田達也, 桐山修八 (1997) 回-直腸吻合および正常ラットにおけるハイアミロースコーンスターチの消化率. *日本栄養・食糧学会誌* **50**, 209-16.
- 12) Kasaoka S, Ikai M, Oh-hashii A, Morita T, Kiri-yama S (1997) High amylose corn starch retarded 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced mammary tumor development in female rats. *Nutr Res* **17** : 1035-46.
- 13) Morita T, Kasaoka S, Oh-hashii A, Ikai M, Numasaki Y, Kiri-yama S (1998) Resistant protein alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. *J Nutr* **128** : 1156-64.
- 14) 笠岡誠一, 森田達也, 猪飼利圭, 大橋 晃, 桐山修八 (1998) ハイアミロースコーンスターチ摂取によるラットの血中脂質上昇ならびに体脂肪蓄積抑制作用. *日本栄養・食糧学会誌* **51**, 345-53.
- 15) 桐山修八, 笠岡誠一, 長谷耕二, 猪飼利圭, 森田達也 (1999) レジスタントプロテインによるラット盲腸内発酵制御: オリゴメチオニンの添加効果. 必須アミノ酸研究 **154**, 5-14.
- 16) Scheppach W, Fabian C, Ahrens F, Spengler M, Kasper H (1988) Effect of starch malabsorption on colonic function and metabolism in human. *Gastroenterology* **95** : 1549-55.
- 17) Phillips J, Muir JG, Birkett A, Lu ZX, Jones GP, O'Dea K, Young GP (1995) Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in human. *Am J Clin Nutr* **62** : 121-30.
- 18) Tomlin J, Read NW (1990) The effect of resistant starch on colon function in humans. *Br J Nutr* **64** : 589-95.
- 19) Knutson CA (1986) A simplified colorimetric procedure for determination of amylose in maize starches. *Cereal Chem* **63** : 89-92.
- 20) 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.
- 21) American Institute of Nutrition (1977) Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standard for nutritional studies. *J Nutr* **107** : 1340-8.
- 22) 奥田拓道, 藤井節郎 (1966) 血中アンモニア直接比色定量法. *最新医学* **21**, 622-7.
- 23) Hoshi S, Sakata T, Mikuni K, Hashimoto H, Kimura S (1994) Galactosylsucrose and xylosyl-fructoside alter digestive tract size and concentrations of cecal organic acids in rats fed diets containing cholesterol and cholic acid. *J Nutr* **124** : 52-60.
- 24) Miller L, Houghton JA (1945) The micro-Kjeldahl determination of the nitrogen content of amino acids and protein. *J Biol Chem* **159** : 373-80.
- 25) Czerkawski JW (1974) Methods for determining 2,6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. *J Sci Food Agric* **25** : 45-55.
- 26) 柴田寛三 (1974) 生物統計学序説, p. 64. 創文, 東京.
- 27) Zar JH (1984) *Biostatistical Analysis* (2nd ed), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- 28) Andrieux C, Pacheco ED, Bouchet B, Gallant D, Szyliet O (1992) Concentration of digestive tract microflora to amylomaize starch degradation in the rat. *Br J Nutr* **67** : 489-99.
- 29) Topping DL, Gooden JM, Brown IL, Biebrick DA, McGrath L, Trimble RP, Choct M, Illman RJ (1997) A high amylose (amylomaize) starch raises proximal large bowel starch and increases colon length in pig. *J Nutr* **127** : 615-22.
- 30) Remesy C, Demigne C (1989) Specific effects of fermentable carbohydrate on blood urea flux and ammonia absorption in the rat cecum. *J Nutr* **119** : 560-5.
- 31) Caldarini MI, Pons S, D'agostino D, Depaula JA, Greco G, Negri G, Ascione A, Bustos D (1996) Abnormal fecal flora in a patient with short bowel syndrome. An *in vitro* study on effect of pH on D-lactic acid production. *Dig Dis Sci* **41** : 1649-52.
- 32) Macfarlane GT, Gibson GR (1995) Microbiological aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel. In: *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids* (Cummings JH, Rombeau IL, Sakata T, eds), p. 87-105. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 33) Ichikawa H, Sakata T (1997) Effect of L-lactic acid, short-chain fatty acids, and pH in cecal infusate on morphometric and cell kinetic parameters of rat cecum. *Dig Dis Sci* **42** : 1598-610.

(1999年2月1日受付, 1999年4月12日受理)