

ラットのカルシウム吸収に及ぼすトレハロースの影響

内田三香子, 村上亜由美, 松浦 寿喜, 市川 富夫
(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Effect of Trehalose on Calcium Absorption in Rats

Mikako Uchida, Ayumi Murakami, Toshiki Mathuura and Tomio Ichikawa

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan*

Since the intestinal digestibility of trehalose was considered to be very poor, we studied the effects of trehalose on calcium absorption. In this study, the digestibility of trehalose by rat intestinal acetone powder, and calcium utilization by rat fed on trehalose were carried out. Trehalose as well as sucrose was completely digested, whereas lactose was digested by only 15%. Trehalose did not positively influence calcium absorption and the effect of trehalose on calcium absorption was similar to that of sucrose. The apparent absorption ratio during both periods (7-10 days, 20-23 days) were significantly increased in rats fed the lactose diet. Whole cecal weight was significantly elevated in rats fed the lactose diet, cecal pH was significantly lowered, and the amounts of short chain fatty acid in the cecum contents were significantly increased. These results suggest that since trehalose was completely digested in intestinal lumen, it did not show influence on calcium absorption.

緒 言

トレハロースは、2分子のグルコースが1,1結合した非還元性の糖質であり、自然界には動植物、微生物、茸類、酵母類などに広く分布している。¹⁾砂糖の約半分の甘味を持ち、酸に対して安定で、熱を加えることにより褐色化することもないので甘味料として、また、乾燥、凍結といった特殊環境下における生命の保存や再生に深く関与し、²⁾さらに生体膜や蛋白質の保護効果を有している³⁾ため、冷凍食品や乾燥食品への利用、⁴⁾医薬品の安定剤、化粧品保湿剤などとして利用されている。現在、種々の方法でのトレハロースの製造法が研究され、^{5,6)}安価に製造することが可能になり、ますます多方面への利用が期待されている。しかし、トレハロースの生体内利用についてはまだ不明な点が多い。トレ

ハロースは生体内酵素による水解活性が極めて低いことが知られている。⁷⁾ラクトースはカルシウムの吸収を促進するが、^{8,9)}これはラクトースの水解活性が低く、小腸において難消化性であることによることも報告されている。以上のことを考え合わせ、トレハロースのカルシウム吸収促進効果の可能性を検討した。ラット小腸アセトン粉末によるトレハロースの消化分解性ならびに、ラットのカルシウム吸収に及ぼす影響を調べた。

飼料および試薬

1. 飼育飼料

シュクロースおよびラクトースは和光純薬市販特級品を用いた。トレハロースは林原生物化学研究所より供与された。飼料作成用の物質はオリエンタル

酵母(株)から購入した。

2. 試薬

消化実験では酵素源として小腸アセトン粉末(Sigma社製)を用いた。血漿アルカリホスファターゼ活性測定にはアルカリホスファターゼ K-テストワコー(和光純薬)を用いた。カルシウム測定用 Ca 標準溶液および揮発性脂肪酸標準物質(酢酸, プロピオン酸, 酪酸)はいずれも和光純薬市販特級品を用いた。リンの測定にはホスファ C-テストワコー(和光純薬)を用いた。他の試薬は全て特級品を用いた。

実験方法

1. ラット小腸アセトン粉末によるトレハロースの消化実験¹⁰⁾

市販のラット小腸アセトン粉末 100mg を生理食塩水 1ml の割合に溶解し酵素液とした。トレハロースは、0.1M マレイン酸緩衝液(pH6.0)に 20mg/ml になるように溶解し、37℃で0~3時間反応分解させた。反応液を遠心し、その上清を TLC 法¹¹⁾により生成単糖を分離後、生成単糖量をフェノール硫酸法¹²⁾により測定し、分解率を求めた。同時にシュクロース、マルトースの分解率も求めた。

2. ラットを用いたカルシウム利用性実験

1) 飼育飼料

実験飼料組成を Table 1 に示した。蛋白質源をカゼイン、糖質源を主にコーンスターチ、脂質源をコーンオイルとし、ビタミン類、ミネラル類は AIN-76 の組成に従った。シュクロースを混合したものを標準飼料とし、シュクロースをラクトースに置き換えたものをラクトース飼料、トレハロースに置き換えたものをトレハロース飼料とした。

調製した飼料は各 1g を精秤し、550℃の電気炉で 15 時間灰化し、1N 塩酸で溶解したものを試料とし、カルシウム含量を 0.5% 塩化ランタン存在のもと原子吸光光度法¹³⁾で求めた。カルシウム含有率は、シュクロース飼料 0.45%、ラクトース飼料 0.44%、トレハロース飼料 0.44% であり、各群に違いはみられなかった。リン含有率にも違いはみられなかった。

2) 実験動物の飼育

4 週令 SD 系雄ラットを日本クレア(株)より 18 匹購入し、個別ゲージにて、室温 23±1℃、湿度 55±7%、12 時間ごとの明暗サイクル(8:00am~8:00pm, 8:00pm~8:00am)の環境下で飼育した。

Table 1. Composition of experimental diet.

	Group		
	Sucrose	Lactose	Trehalose
Casein	20.0	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Corn Starch	50.0	50.0	50.0
Sucrose	15.0	—	—
Lactose	—	15.0	—
Trehalose	—	—	15.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0
Vitamin mix* ¹	1.0	1.0	1.0
Choline chlorise	0.2	0.2	0.2
Mineral mix* ²	3.5	3.5	3.5
Ca %	0.45	0.44	0.44
P %	0.52	0.52	0.52

*¹ AIN-76 Vitamin mix

*² AIN-76 Mineral mix

シュクロース飼料で 1 週間予備飼育した後、1 群 6 匹の 3 群に分け、各飼料で 23 日間飼育した。試験期間中の飼料、およびイオン交換水は自由摂取とした。試験期間中の体重は 1 週間に 1 度、飼料摂取量は 2~3 日に 1 度測定した。

3) 出納実験

カルシウムの出納実験は、飼育前期(7-10 日)、後期(20-23 日)の 2 回実施した(Fig.1)。24 時間尿および糞は、ポリエチレン濾紙(千代田保安用品(株))を敷いた上で採取した。糞については乾燥重量を測定した後粉末とし、一定量を 550℃の電気炉で 15 時間灰化し、1N 塩酸で抽出したものを試料とした。尿は、尿をしみこませた濾紙を約 2×3cm に切断し、2N 塩酸で 1 時間抽出したものを試料とした。糞尿中のカルシウム量は、塩化ランタン存在のもと原子吸光光度法で測定した。カルシウムの吸収率、および体内保留率は糞尿中へのカルシウム排泄量から次式により算出した。

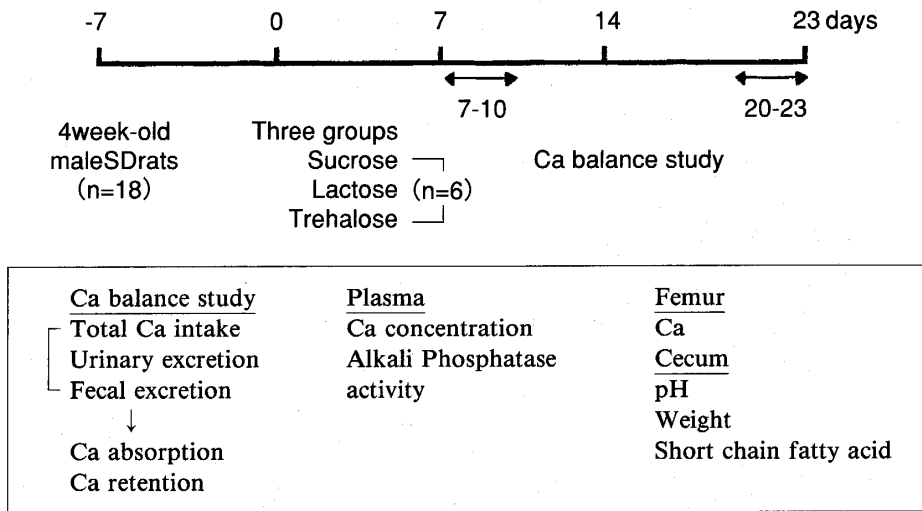
$$\text{吸収率(\%)} = \frac{\text{摂取量} - \text{糞中排泄量}}{\text{摂取量}} \times 100$$

$$\text{体内保留率(\%)} = \frac{\text{摂取量} - \text{糞中排泄量} - \text{尿中排泄量}}{\text{摂取量}} \times 100$$

4) 血漿カルシウム濃度および血漿アルカリホスファターゼ活性の測定

飼育終了日にネンブタール麻酔下のラット腹部大動脈よりヘパリン処理した注射器で採血し、遠心分離し血漿を分離した。カルシウム濃度は、血漿 0.25ml に 4% トリクロール酢酸・0.5% 塩化ランタ

Fig. 1. Experimental design.



ン溶液を加え、遠心分離して得られた上清を原子吸光光度法にて測定した。アルカリホスファターゼ活性は、P-ニトロフェニールリン酸法を用いるアルカリホスファ K-テストワコーにて測定した。

5) 大腿骨のカルシウム量の測定

膝関節部と骨盤ヒンジ骨より脱離した大腿骨から骨膜を剥離した後、湿重量と、骨長はノギスを用いて測定した。カルシウム量は、600℃で15時間灰化し灰化重量を測定した後、塩酸で溶解したものを原子吸光光度法で測定した。カルシウム含有率(%)は、大腿骨灰化物重量当たりで算出した。

6) 盲腸内容物 pH および揮発性脂肪酸量の測定

盲腸は、摘出後-30℃のフリーザーで測定まで保存した。盲腸内容物湿重量1gあたり10mlの蒸留水を加え、pHを測定した。揮発性脂肪酸量は、その混合液を遠心分離し(3000rpm.20min)、得られた上清に10%硫酸1mlとクロロホルム・メタノール溶液を5mlを加え、抽出し、再び遠心分離し(3000rpm.20min)、得られたクロロホルム・メタノール層を試料とした。分析には、サーモン3000(信和化工)を充填剤としたガラスカラムを装着したGLC(島津. GC-14B)を用い測定した。

7) 統計解析

表中の数値はすべて平均±標準偏差を示した。有意差の検定は、ANOVA法により分散分析を行った後Turkey法により3群間の検定を行った。危険率は5%以下を有意とした。

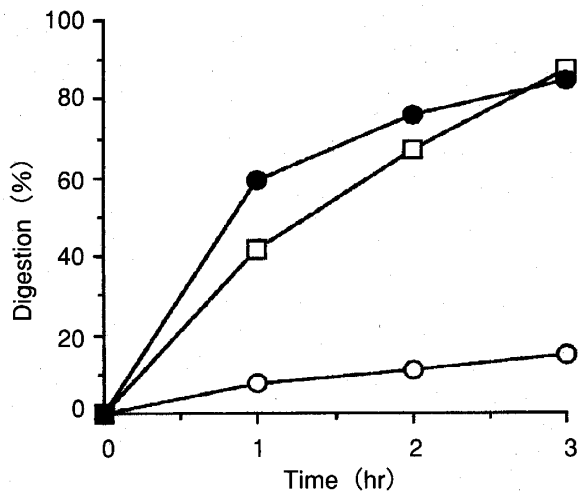


Fig. 2. Sucrose, lactose and trehalose digestion by rat intestinal acetone powder. □, sucrose: ○, lactose: ●, trehalose

実験結果

1. トレハロースの消化性

実験方法に記述した方法で行った。Fig.2に結果を示した。トレハロースはシュクロース同様、3時間消化では両者とも100%近く消化された。ラクトースは3時間の消化実験にもかかわらず15%の消化率であった。

2. トレハロースによるラットのカルシウム利用性実験

シュクロース15%を標準食とし、15%ラクトース食、15%トレハロース食をそれぞれ与え23日間

飼育した。体重による成長曲線を Fig.3 に示した。各群とも順調に成長し、飼料摂取量、食効率とも差はなかった。血漿カルシウム濃度および血漿アルカリホスファターゼ活性を Table 2 に示した。これらはいずれも差は見られなかった。カルシウムの出納実験結果を Table 3 および Fig.4 に示した。前期では、糞中カルシウム排泄量はラクトース群がトレハロース群よりも有意に低値を示し、尿中カルシウム排泄量はラクトース群がシュクロース群、トレハロース群よりも有意に高値を示した。みかけの吸収率は、ラクトース群が $80.0 \pm 2.7\%$ 、シュクロース群が $74.3 \pm 2.2\%$ 、トレハロース群が $70.4 \pm 5.3\%$ であり、ラクトース群が有意に高値を示した。体内保有率においても同様の傾向を示した。後期では、糞中カルシウム排泄量には差は見られなかったが、尿中カルシウム排泄量は前期同様ラクトース群で高値を示した。吸収率においてもラクトース群が他の2群よりも有意に高値を示した。大腿骨の測定結果を Table 4 に示した。湿重量、骨長、灰化重量、カルシウム(%)には3群間に差は見られなかったが、カルシウム量については、ラクトース群がトレハロース群よりも有意に高値を示した。盲腸内 pH、盲腸内容物量を Table 5 に示した。トレハロース群は pH、内容物量ともにシュクロース群と同等であった。ラクトース群は pH ではシュクロース群、トレハロース群よりも有意に低値を示し、内

容物量は有意に高値を示し、2倍以上もの高い盲腸を産出した。揮発性脂肪酸量においても同様であり、ラクトース群は他の2群よりも2倍以上もの高値を示した。

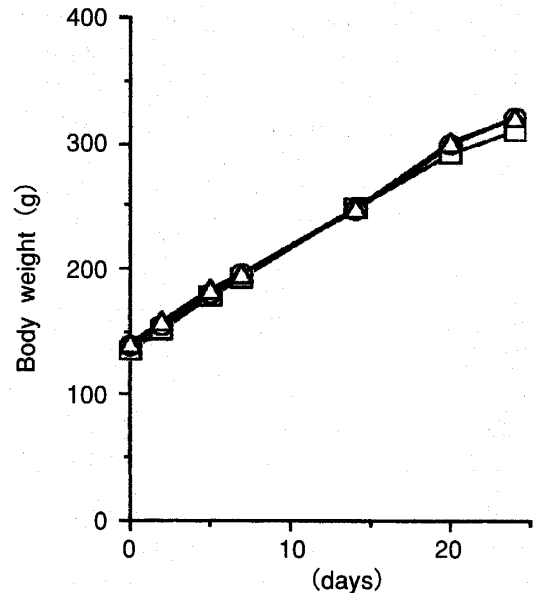


Fig. 3. Growth curve of rats fed sucrose diet, lactose diet or trehalose diet. Animal were fed sucrose(□), lactose(○), trehalose(△) diet.

Table 2. The concentration of Ca and Alkaline Phosphatase activity(Alp) in plasma.

	Sucrose n=6	Lactose n=6	Trehalose n=6
Ca(mg/dl)	10.82 ± 0.22	10.81 ± 0.22	10.54 ± 0.20
Alp(K-A)	28.1 ± 4.9	26.4 ± 10.0	29.1 ± 7.1

Table 3. Effect of trehalose on the calcium excretions into feces and urine in the rats.

	Sucrose n=6	Lactose n=6	Trehalose n=6
7~10days			
Intake(mg/day)	89.3 ± 9.3	87.6 ± 8.4	88.8 ± 5.7
Fecal excretion(mg/day)	23.0 ± 3.5	$17.5 \pm 2.8^{\dagger\dagger}$	26.4 ± 9.6
Uninary excretion(mg/day)	2.82 ± 0.26	$5.10 \pm 1.59^{**\dagger\dagger}$	2.47 ± 0.34
20~23days			
Intake(mg/day)	98.3 ± 11.8	105.3 ± 10.8	102.2 ± 11.6
Fecal excretion(mg/day)	29.2 ± 5.7	25.8 ± 3.6	32.0 ± 5.2
Uninary excretion(mg/day)	2.58 ± 0.20	$5.25 \pm 2.66^{*\dagger}$	2.26 ± 0.54

** , * Statistically significant at the $P < 0.01$, $P < 0.05$ level when compared with control.

††, † Statistically significant at the $P < 0.01$, $P < 0.05$ level when compared with trehalose.

考 察

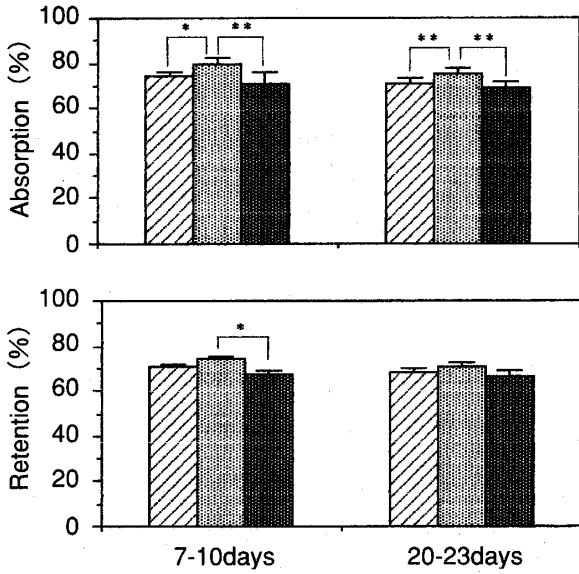


Fig. 4. Effect of trehalose on calcium absorption in rats (n=6).
 □, sucrose; ▨, lactose; ■, Trehalose.
 **, *significantly different at the p<0.01, P<0.05 level.

ラクトースはカルシウムの吸収を促進することが知られている。難消化性の糖であるラクトースは二糖類のまま腸管内に多く存在するため、浸透圧作用によりカルシウムの腸粘膜透過性を促進させ、その吸収を活性化させると考えられている。¹⁴⁾ 小腸内でのカルシウム吸収に対する活性効果が、小腸での分解されなかった難消化性糖の存在であるならば、小腸で分解に抵抗する糖類は同様の効果をもつ可能性があり、ラクチュロース、¹⁵⁾ マルチトール、¹⁶⁾ オリゴ糖^{17, 18)} など多くの難消化性糖のカルシウム吸収効果が研究され、カルシウム吸収促進作用が認められている。本研究では、生体内酵素による水解活性が極めて低いとされるトレハロースに注目し、カルシウム吸収促進効果についての検討を行った。

ラット小腸アセトン粉末を用いて各糖の小腸での分解率を求めたところラクトースは反応3時間でも15%しか分解されなかったが、トレハロースはシュクロースと同様に殆どが単糖類に分解された。1時間、2時間反応においてはシュクロースよりも多く分解され、トレハロースは小腸で十分に消化分解される可能性がみられた。平山ら⁷⁾は、小腸粘膜

Table 4. Effect of trehalose on wet weight, length, calcium content of left femur in rats.

	Sucrose n=6	Lactose n=6	Trehalose n=6
Wet weight (g)	0.65±0.06	0.66±0.04	0.65±0.04
Length (mm)	31.02±1.77	31.61±1.14	31.69±1.13
Ash weight (g)	0.21±0.02	0.22±0.01	0.21±0.01
Ca content (mg)	78.37±4.35	83.33±4.77††	75.31±3.31
Ca% (Ca/Ash×100)	36.9±0.9	37.1±1.2	35.9±1.9

†† Statistically significant at the P<0.01 level when compared with trehalose.

Table 5. Effect of trehalose on pH, weight and short chain fatty acids contents of cecum.

	Sucrose n=6	Lactose n=6	Trehalose n=6
pH	7.63±0.19	7.09±0.38**††	7.64±0.16
Weight of contents in the cecum (g)	2.75±1.09	6.97±2.36**††	2.86±0.32
Short chain fatty acids (mg/cecum/rat)			
Acetic acid	5.92±3.13	11.92±4.16**††	5.07±0.62
Propionic acid	2.38±1.11	6.70±1.74**††	2.52±0.23
Butyric acid	2.20±0.96	5.09±2.15**††	2.13±0.27

** Statistically significant at the P<0.01 level when compared with control.

†† Statistically significant at the P<0.01 level when compared with trehalose.

ホモジネートと小腸アセトンパウダーを酵素源として、各種糖質の水解活性を測定している。小腸粘膜ホモジネートではトレハロースはシュクロースの54%、小腸アセトンパウダーではシュクロースの6.9%の水解率とする結果を示したが、本実験ではそれとは異なる結果となった。実際にラットによるトレハロース過剰摂取によるカルシウム吸収促進効果を検討した。出納実験では、トレハロースはシュクロースと同等の結果が得られ、カルシウム吸収促進効果はみられなかった。ラクトースは尿中カルシウム排泄量を増加させ、糞中カルシウム排泄量を減少させた。これは腸管からのカルシウム吸収増加を反映した結果であり、吸収率は前期80.0%、後期75.5%と、他の群よりも有意に上昇し、本実験においてもラクトースのカルシウム吸収促進効果がみられた。また、ラクトースはカルシウム吸収を促進させ、その結果大腿骨カルシウム含量にも影響を及ぼし、骨中にカルシウムの蓄積がみられている。また、ラクトースを与えたラットの盲腸内pHはシュクロースやトレハロースより有意に低下し、著しく増大する盲腸重量を産出した。盲腸内揮発性脂肪酸量の増大もみられ、これらはラクトースの低い消化性とラクトースが腸内バクテリアによる発酵の基質となることを示している。カルシウムは主として小腸で吸収されると言われているが、最近の研究では、下部消化管における発酵性により生成した揮発性脂肪酸量のカルシウムの吸収促進の役割も重要なものと報告されている。^{19, 20}本研究におけるラクトースのカルシウム吸収効果は、盲腸での揮発性脂肪酸の増大した生産とそれに関連するpH減少が、ラットの盲腸液体相のカルシウム内容物の増加を引き起こし、ここで吸収されるべきカルシウム量が引き上げられたとするラクチュロース²¹やガラクトオリゴ糖¹⁸の報告と一致するかもしれない。ラクトースは大腸においても難消化性糖として働くが、トレハロースはラット小腸内で殆どが消化吸収され、大腸には存在せず下部消化管にも何ら影響を及ぼさないことが示唆される。他方、ラクトースのカルシウム吸収促進作用にはこれらの仮説に反する報告もある。ラクトースは盲腸を切除したラット¹⁵や無菌ラット^{22, 23}においてもカルシウムの吸収を増加させた。このことは、ラクトースのカルシウムの吸収増大に、細菌による発酵が関与しないことを示唆するものである。これらは難消化性糖の発酵によるpHの低下が盲腸内カルシウムの可溶性を高め

るとする考えを支持するものではない。この実験においてはラクトースは小腸および大腸いずれかにおいてカルシウムの吸収を活性化させ、これはラクトースが難消化性糖であることによるものと考えられる。トレハロースは小腸内で殆どが消化分解された可能性があり、カルシウム吸収には影響を及ぼさなかったと考えられる。

要 約

本研究は、生体内酵素における水解活性が極めて低いとされるトレハロースに注目し、ラットのカルシウム吸収に及ぼす影響を検討した。

1) *in vitro*でのラット小腸アセトン粉末による糖の消化分解性を検討した。37°C 3時間反応ではトレハロースはシュクロース同様、殆どが消化分解された。ラクトースでは15%しか消化されなかった。

2) 5週齢SD系雄ラットを1群6匹の3群に分け、15%シュクロース飼料、15%ラクトース飼料、15%トレハロース飼料でそれぞれ23日間飼育後解剖した。飼育期間中に2回の出納実験を行い、カルシウム吸収に及ぼす影響を検討した。解剖時には臓器および大腿骨を摘出し、盲腸については盲腸内pHおよび盲腸内揮発性脂肪酸量を定量し、大腿骨についてはカルシウム含有量を測定した。

(1) カルシウム吸収率ならびに体内保留率はラクトース群で有意に高くなり、トレハロースによる影響は見られなかった。

(2) ラクトース群はシュクロース群、トレハロース群よりも2倍以上もの盲腸重量を産出した。また、ラクトース群は盲腸内pHを有意に低下させ、揮発性脂肪酸量は有意に高値を示した。トレハロースはシュクロース同様、差は見られなかった。

以上から、トレハロースは小腸内で殆どが消化分解された可能性があり、カルシウム吸収には影響を及ぼさなかったと考えられる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料のトレハロースを提供していただきました林原生物化学研究所に感謝いたします。

文 献

- 1) 杉本利行, 食品工業, 34-39(1995.5.30)
- 2) 平澤計介, 日本結晶学会誌, 35, 220, 34-36(1993)
- 3) 日野明寛, バイオサイエンスとインダストリー, 53, 1, 29-31(1995)
- 4) 河合弘泰, 生物と化学, 31, 6, 374-381(1993)
- 5) 田淵彰彦, 万代隆彦, 渋谷 孝, 福田恵温, 杉本利行, 栗本雅司, 応用糖質科学誌, 42, 4, 401-406(1995)
- 6) 杵淵美倭子, 山崎 彬, 山本皓二, 応用糖質科学, 42, 3, 237-242(1995)
- 7) 平田匡男, 豊田恭子, 山田和彦, 日高秀昌, 澱粉科学, 37, 4, 259-262(1990)
- 8) Wasserman, R.H., Comar, C.L. and Nold, M.M., *J.Nutr.*, 59, 371-383(1956).
- 9) Armbrrecht, H.J. and Wasserman, R.H., *J.Nutr.*, 106, 1265-1271(1976).
- 10) 市川富夫, 矢野友啓, 医学と生物学, 126, 4, 161-163(1993).
- 11) Yamamoto, K., Yoshikawa, K., and Okada, S., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(9), 1450-1453(1993).
- 12) Dubois, M., Gilles, K., A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A. and Smith, F., *Anal. Chem.*, 28, 350-356(1967)
- 13) 「食品分析ハンドブック」, 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之監修, 建帛社, 東京, 281-283(1982).
- 14) Bronner, F., *J.Nutr.*, 117, 1347-1352(1987).
- 15) Brommage, R., Binacua, C., Antille, S. and Carrie, A., *J.Nutr.*, 123, 2186-2194(1993).
- 16) Goda, T., Yamada, M., Takase, S. and Hosoya, N., *J.Nutr. Sci. Vitaminol*, 38, 277-286(1992).
- 17) 太田篤胤, 越坂部奈緒美, 山田和彦, 斎藤安弘, 日高秀昌, 栄食誌, 46, No.2, 123-129(1993).
- 18) Chonan, O. and Watanuki, M., *J.Nutr. Sci. Vitaminol*, 41, 95-104(1995).
- 19) Demigne, C., Levrat, M. and Remesy, C., *J.Nutr.*, 119, 1625-1630(1989).
- 20) Schulz, A.G.M., Amelsvoort, J.M.M. and Beynen, A.C., *J.Nutr.*, 123, 1724-1731(1993).
- 21) Heijnen, A.M.P., Brink, E.J., Lemmens, A.G. and Beynen, A.C., *Br.J.Nutr.*, 70, 747-756(1993).
- 22) Andrieux, C. and Sacquet, E., *Reprod. Nutr. Dev.*, 22, 387-394(1982).
- 23) Andrieux, C. and Sacquet, E., *Reprod. Nutr. Dev.*, 23, 259-271(1983).