

## 馬鈴薯澱粉から調製したリン酸化オリゴ糖の ラットのカルシウム吸収に及ぼす影響

岸本三香子\*, 釜阪 寛\*\*, 村上亜由美\*, 川口真規子\*,  
松浦 寿喜\*, 岡田 茂孝\*\*, 市川 富夫\*

(\*武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科 \*\*江崎グリコ(株)生物化学研究所)

## Effect of Phosphorylated Oligosaccharide from Potato-starch on Calcium Absorption in Rats

Mikako Kishimoto\*, Hiroshi Kamasaka\*\*, Ayumi Murakami\*, Makiko Kawaguchi\*,  
Toshiki Matsuura\*, Shigetaka Okada\*\* and Tomio Ichikawa\*

*\*Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Sciences,  
Mukogawa Womens University, Nishinomiya 663, Japan*

*\*\*Biochemical Research Laboratory,  
Ezaki Glico Co., Ltd. Osaka 555, Japan*

Previously, we observed the inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharides(PO) from potato-starch on the formation of calcium phosphate precipitate. PO were composed of PO-1 fraction and PO-2 fraction. The former was maltooligosaccharide bound to one phosphate molecule, the latter was maltooligosaccharide bound to at least more than two phosphate molecules. PO-2 had the stronger inhibitory effect. In the present study, we investigated the effect of PO-2 feeding on calcium utilization in rats. Five-week-old rats were fed calcium diet(0.52% of calcium) containing 5% PO-2 for two weeks. Apparent calcium absorption ratio and apparent retention ratio during periods(day3~6, day10~14) were significantly lower in rats fed the PO-2 diet than in the control diet. Results of the test on breaking-force and calcium-content of the femurs were not different between two groups. Whole cecal weight was significantly elevated in rats fed the PO-2 diet and the amounts of short chain fatty acid in the cecum content were significantly increased. Cecal pH was not changed. We could not observed the relationship of the stronger inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharide PO-2 to utilization of calcium.

### 緒言

カルシウム(Ca)の腸管での吸収には、その腸管内における溶解性が大きく寄与していることが明らかにされている<sup>1)</sup>。すでに開発された CPP<sup>2)3)</sup>や

CCM<sup>4)5)</sup>についても、そのような考えでそれらの腸管における吸収性の良さが説明されている。我々はリン酸化糖がCaの可溶化を促進することを見だし、馬鈴薯澱粉をアミラーゼ処理し、リン酸化オリゴ糖を調製した。これがリン酸基が1個結合した平

均重合度 $\approx 4$ のマルトオリゴ糖(PO-1画分)65%とリン酸基が2個以上結合した平均重合度 $\approx 6$ のマルトオリゴ糖(PO-2画分)12%とその他の混合物であることを明らかにした。またPO-1画分よりPO-2画分の方がCa溶解性が強いことも明らかにし<sup>6)</sup>、さらにPO-1, PO-2混合物を用いてラットでのCa利用実験を行ったが、吸収を改善させる結果は得られなかった<sup>7)</sup>。そこで今回Caの溶解性が大きいPO-2画分を分離調製し、ラットにおけるCa吸収促進効果について検討した。

## 実験方法

### 1. 実験動物および飼育方法

4週令SD系雄ラットを日本クレア(株)より購入し、個別ゲージにて、室温 $23\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55\pm 7\%$ 、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。標準飼料で1週間予備飼育した後、各飼料で2週間飼育した。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2度、飼料摂

Table 1. Composition of experimental diet.

	Control	5% PO-2
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn oil	5.0	5.0
Cellulose powder	5.0	5.0
Vitamin mix <sup>1)</sup>	1.0	1.0
Choline	0.2	0.2
Salt mix	3.5 <sup>3)</sup>	3.5 <sup>2)</sup>
CaCO <sub>3</sub>	—	0.533
CaHPO <sub>4</sub>	—	0.730
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	0.034
Sucrose	10.0	4.118
PO-2 fraction <sup>4)</sup>	—	5.882
Ca (%)	0.52	0.52
P (%)	0.4	0.4

Prepared according to AIN-76 prescription.

<sup>1)</sup>AIN-76 Vitamin mix(Oriental Yeast Co., Ltd.).

<sup>2)</sup>AIN-76 Mineral mix(Ca, P free)(Oriental Yeast Co., Ltd.).

<sup>3)</sup>AIN-76 Mineral mix(Oriental Yeast Co., Ltd.).

<sup>4)</sup>Phosphorylated oligosaccharide. fraction-2.

取量は2~3日に1度測定した。Caの出納実験は、試験開始3~6日及び飼育終了前の11~14日の各4日間実施した。ラットは各群それぞれ7匹用いた。

### 2. 飼育飼料

リン酸化オリゴ糖(PO-2画分)は釜坂ら<sup>6)</sup>の方法により調製し、他の飼料成分はオリエンタル酵母(株)製を用いた。試験飼料組成をTable 1に示したように、AIN-76組成に従い調製した。各飼料はCa:0.52%、リン(P):0.40%になるよう調製した。各飼料の実測値はCa:0.49%、P:0.51%であり両飼料間に差はなかった。

### 3. 出納実験

24時間尿および糞は、ポリエチレン濾紙A(千代田テクノル(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Ca量は、塩化ランタン存在のもと原子吸光光度法<sup>8)</sup>(原子吸光分光分析装置:ジャーレルアッシュ社 AA-1型)で測定した。Caの吸収率、および体内保留率は糞尿中へのCa排泄量から次式により算出した。

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

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

### 4. 血漿中Ca濃度及びアルカリフォ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。Ca濃度測定はカルシウムC-テストワコー、アルカリフォスファターゼ活性測定はアルカリ性フォスファ K-テストワコー(いずれも和光純薬(株)製)を使用した。

### 5. 大腿骨のCa量ならびに強度の測定

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。骨強度については、骨強度測定装置(K.K マルトー)を用いて曲げ試験および、ねじり試験を行った。曲げ強度は荷重(kgf)、ねじり強度は(kgf·cm)で示した。Ca量は、曲げ試験に用いた左脚を用いて、600℃で8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。

**Table 2.** Effect of phosphorylated oligosaccharide(PO-2)on body weight gain, food intake and food efficiency.

n=7	Control	PO-2
Body weight		
Initial(g)	142.4±7.3	140.0±7.1
Final(g)	254.3±13.5	266.3±19.7
Weight gain(g)	111.9±14.6	126.3±14.0
Food intake		
g/d	20.3±1.6	22.8±1.9
g/14d	284.2±22.4	318.8±26.8
Food efficiency		
Body weight gain /food intake	0.39±0.03	0.40±0.02

**Table 3.** Effect of phosphorylated oligosaccharide(PO-2)on various organs' weights.

n=7	Control	PO-2
Kidney(g)	2.09±0.18	2.02±0.18
Spleen(g)	0.97±0.18	0.90±0.14
Liver(g)	12.85±1.73	14.06±1.89
Heart(g)	0.94±0.09	1.02±0.11
Lung(g)	1.25±0.10	1.32±0.10

**Table 4.** Effect of phosphorylated oligosaccharide(PO-2)on Ca and Alkaline phosphatase activity(Alp)in Plasma.

n=7	Control	PO-2
Ca(mg/dl)	10.45±0.43	10.70±0.40
Alp(K-A)	30.97±7.55	39.53±11.82

**Table 5.** Effect of phosphorylated oligosaccharide(PO-2)on femur properties.

n=7	Control	PO-2
Wet weight(g)		
(R)	0.59±0.03	0.60±0.05
(L)	0.59±0.04	0.61±0.04
Length(mm)		
(R)	27.70±0.46	28.38±0.50
(L)	27.43±0.83	28.26±0.41
Ca content(mg)	74.00±3.96	74.06±3.83
Breaking force		
Load(kgf)	6.797±1.365	6.323±0.290
Torque(kgf·cm)	2.904±0.402	2.786±0.605

**Table 6.** Effect of phosphorylated oligosaccharide(PO-2)on pH, weight and short-chain fatty acid composition of the cecal contents.

n=7	Control	PO-2
pH	7.88±0.11	7.81±0.12
Weight of contents in the cecum(g)		
	2.21±0.18	2.73±0.52*
Short chain fatty acid(mg/cecum/rat)		
Acetic acid	3.93±0.50	5.50±1.85
Propionic acid	1.71±0.26	2.66±0.87*
Butyric acid	1.45±0.24	2.20±0.95
Total VFA	7.08±0.88	10.36±3.60*

\* Statistically significant at the P<0.05 level when compared with control.

## 6. 盲腸内容物 pH および揮発性脂肪酸量の測定

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、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)を用いた。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を用いた。

## 7. 統計解析

表中の数値はすべて平均±標準偏差を示した。有意差の検定は比較すべき数値の等分散性を F-検定により検定後、t-検定により行った。危険率は 5% 以下を有意とした。

## 実験結果

標準飼料のシュクロースの一部をリン酸化オリゴ糖(PO-2 画分)が 5% となるよう調製した飼料でラットを 2 週間飼育した。対照群, リン酸化オリゴ糖群いずれも初期体重 140g から約 260g へと順調に成長し, 体重, 食摂取量, 食効率とも差は認められなかった(Table 2)。各臓器重量(Table 3)および血漿カルシウム濃度, アルカリフォスファターゼ活性(Table 4)も同様に差はみられなかった。Ca の

出納実験の結果を Fig.1 に示した。Ca 吸収率は、試験開始 3~6 日では対照群は 70.5% に対し、リン酸化オリゴ糖群は 61.9% であり、また試験終了前 11~14 日では対照群は 57.1% に対し、リン酸化オリゴ糖群は 42.8% であり、リン酸化オリゴ糖群は糞中排泄量の増加により有意に低値を示した。また、体内保留率も同様の結果を示した。摘出した大腿骨の重量、骨長、Ca 含量、および骨強度は差は

認められなかった (Table 5)。Table 6 に盲腸内 pH および盲腸重量を示した。盲腸重量および盲腸内容量はリン酸化オリゴ糖群が有意に高値を示したが、盲腸内 pH には差が見られなかった。揮発性脂肪酸量では酢酸、プロピオン酸、酪酸のいずれにおいてもリン酸化オリゴ糖群で高い傾向を示し、プロピオン酸では有意に高値を示した。また、総脂肪酸量もリン酸化オリゴ糖群で有意に高値を示した。

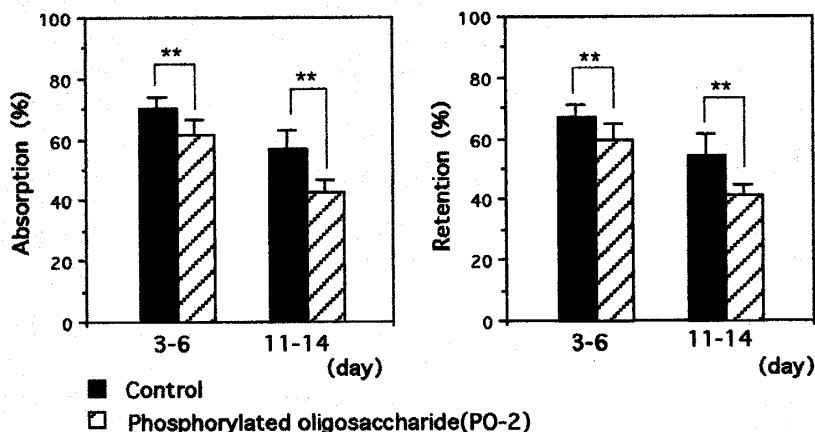


Fig. 1 Effect of phosphorylated oligosaccharide (PO-2) on calcium absorption and retention in rats (n=7).

\*\*Significantly different at the  $p < 0.01$  level.

## 考 察

Ca の吸収を促進するには腸管内での Ca の溶解性が重要な要因となることが知られている。いままでに Ca の溶解性を高める CPP<sup>2)3)</sup>, CCM<sup>4)5)</sup> が開発され、Ca の吸収促進作用が報告されている。糖質では、従来から乳糖<sup>9)10)</sup> が Ca の吸収を促進することが知られており、近年ではマルチトールやソルビトール等の糖アルコール<sup>11)12)</sup>, さらに各種難消化性オリゴ糖<sup>13)~16)</sup> による Ca 吸収促進作用も報告されている。しかし、Ca の溶解性を高める糖質についての報告は少なく、オリゴ糖に関しては、大腸での腸内細菌により代謝される発酵産物の二次的な効果として報告されている。我々は、種々の糖質について広く検索した結果、リン酸基を持つ糖質に Ca 可溶化効果が高いことを確認した<sup>6)</sup>。その構造についてはすでに明らかにし、ラットの飼料摂取による Ca 吸収促進効果についても報告した<sup>7)</sup>。リン酸化オリゴ糖は、リン酸基が 1 個結合した平均重合度 (DP)  $\approx 4$  のマルトオリゴ糖 (PO-1 画分) とリン酸基が 2 個以上結合した DP  $\approx 6$  のマルトオリゴ糖

(PO-2 画分) の混合物からなる。PO-2 画分が CPP と同等の Ca 可溶化効果を持ち、PO-1 画分は CPP の 38% の効果を有することを明らかとしている。PO-1 画分はリン酸化オリゴ糖の 65%、PO-2 画分は 12% を占めていることから、リン酸化オリゴ糖よりも PO-2 画分単独において、より高い Ca 吸収促進効果が認められると推測される。本実験においては、高い可溶化効果を持つ PO-2 画分を分離分取し、ラットに摂取させることにより、Ca 可溶化と Ca 吸収促進効果との関係を明らかにすることを目的として実験を行った。前報において、*in vitro* でのラット小腸アセトン粉末によるリン酸化オリゴ糖の消化分解性を検討し、また、ラット腸管ループ作成による Ca 吸収率を検討した結果、リン酸化オリゴ糖は小腸下部での受動拡散を活性化する可能性を示した。しかし、リン酸化オリゴ糖を 3.5% 含む飼料を用いたラットの摂取実験による Ca 吸収促進効果を検討したところでは、Ca 吸収率は若干高い傾向はみられたが、CPP、CCM で見られたような効果は得られなかった。今回は、前回よりも可溶化効果の強い PO-2 画分を用いたが、Ca 吸収促進作用

はみられず逆に吸収率は有意に低下した。

Caとリン酸の不溶性沈殿の形成を阻止することにより小腸粘膜での可溶性Caの濃度を高め、Caの吸収を促進するとされるCPP<sup>17)</sup>を用いた動物摂取実験では、飼料Ca含量が0.5~0.6%ではCPPのCa吸収促進効果に対する明らかな効果が認められず<sup>18)</sup>、低Ca含量の場合にのみ効果が発現する傾向がみられる<sup>3)</sup>と報告されている。他方、CPPの場合には、Ca源の約80%、P源のすべてをCPPにより供給し飼料Ca含量を0.5%とし、CPPによるCa吸収促進効果が認められた<sup>19)</sup>。今回はCa含量を0.52%とし、Ca源の18%、P源の約50%をリン酸化オリゴ糖により供給した。リン酸化オリゴ糖によりCaの吸収率低下がみられたが、血漿中Ca濃度、および大腿骨に及ぼす影響がみられなかった。これはCa量が影響を与えていることも考えられる。一方、リン酸化オリゴ糖により血漿中P濃度及び尿中P排泄量は有意に高値を示した(結果は示していない)。腎におけるCa吸収が影響していることも考えられる。ラット小腸内においてリン酸化オリゴ糖がどの程度消化されているか明らかではなく、*in vitro*で観察した以上に小腸で消化されている可能性も強く、本条件では*in vitro*でのCa可溶性性とCa吸収促進効果との関係を結びつけることができなかった。

多くの難消化性糖のCa吸収促進効果が小腸で加水分解されない糖の結果として起こるとして、小腸での加水分解に抵抗する各種糖のCa吸収促進効果が報告されている。ラットの飼料摂取による実験では、ラクトースでは12%濃度以上で効果がみられ<sup>20)</sup>、ラクチュロースやガラクトオリゴ糖では5%よりも10%濃度でよりCa吸収促進効果がみられた<sup>13)15)</sup>ことから、今回の5%のリン酸化オリゴ糖添加では効果が少ないとも推察された。また、ミネラルの吸収は主として小腸(上部消化管)での浸透圧作用により腸粘膜透過性を促進することによりCa吸収を活性化させ<sup>13)14)</sup>、また、大腸(下部消化管)においては発酵性や揮発性脂肪酸がCa吸収性を高めるのに重要な役割を持つことが報告されている<sup>21)22)</sup>。難消化性オリゴ糖のCa吸収促進作用は、発酵により生成された揮発性脂肪酸によるpH低下が盲腸内液体相のCa内容を増加させ、吸収されるCa量を引き上げることによるとしている。フラクトオリゴ糖では盲腸内容物中L-乳酸濃度の上昇と関係があるとした<sup>16)</sup>。また、ラクチトールオリ

ゴ糖およびガラクトオリゴ糖では、総揮発性脂肪酸量、とくに酢酸濃度との関連が強いものと報告している<sup>23)</sup>。また、イヌリンではプロピオン酸と関連している<sup>24)</sup>とあり、糖により揮発性脂肪酸に及ぼす影響は様々である。今回用いた5%リン酸化オリゴ糖により盲腸は肥大し、総揮発性脂肪酸量および、プロピオン酸が増加した。腸内細菌による資化が働いたものと推察されるが、盲腸内pHには影響を及ぼさなかったことから、リン酸化オリゴ糖は盲腸でのCaの溶解性を高めるに至らなかったと推察される。

## 要 約

本研究は、馬鈴薯澱粉を酵素処理して得られたリン酸化オリゴ糖から、Ca可溶性効果の強いPO-2画分を分離し、飼料摂取によるラットのCa吸収に及ぼす影響を検討した。

5週齢SD系雄ラットに5%リン酸化オリゴ糖(PO-2画分)を添加した飼料を2週間与え、出納実験によりCa吸収率を求めた。飼育終了後、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、大腿骨については骨破断強度およびCa含有量を測定した。Ca吸収率ならびに体内保留率はリン酸化オリゴ糖群で有意に低値を示した。盲腸重量は有意に増加し、揮発性脂肪酸量は増加した。盲腸内pHには差は見られなかった。また大腿骨破断強度、Ca量には影響は見られなかった。

## 謝 辞

本研究にあたり骨強度を測定させていただきました神戸薬科大学の小林正教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Levinson, D.I. and Bochman, R.S.: *Nutrition Review.*, **52**, 221-232 (1994).
- 2) 内藤 博: 栄食誌, **39**, 433-439 (1986).
- 3) 李 連淑, 朴 眞我, 内藤 博: 栄食誌, **45**, 333-338 (1992).
- 4) Heaney, R.P., Smith, K.T., Recker, R.R. and Hinders, S. M.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **49**, 372-376 (1989).
- 5) Kochanowski, B.A.: *J. Nutr.*, **120**, 876-881 (1990).

- 6) Kamasaka, H., Uchida, M., Kusaka, K., Yoshikawa, K., Yamamoto, K., Okada, S. and Ichikawa, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1412-1416(1995).
- 7) 内田三香子, 釜坂 寛, 松浦寿喜, 岡田茂孝, 市川富夫: *応用糖質科学誌*, **43**, 535-540(1996).
- 8) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之: *食品分析ハンドブック*, 281-283(1982), 建帛社(東京).
- 9) Wasserman, R.H., Comar, C.L. and Nold, M.M.: *J. Nutr.*, **59**, 371-383(1956)
- 10) Armbrrecht, H.J. and Wasserman, R.H.: *J. Nutr.*, **106**, 1265-1271(1976).
- 11) Goda, T., Yamada, M., Takase, S. and Hosoya, N.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**, 277-286(1992).
- 12) 岸 和廣, 合田敏尚, 高橋幸子: *消化吸收* **19**, 81-84(1996).
- 13) Brommage, R., Binacua, C., Antille, S. and Carrie, A.: *J. Nutr.*, **123**, 2186-2194(1993).
- 14) Heijnen, A.M.P., Brink, E.J., Lemmens, A, G. and Beynen, A.C.: *Br. J. Nutr.*, **70**, 747-756(1993).
- 15) Chonan, O. and Watanuki, M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **41**, 95-104(1995).
- 16) 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**, 123-129(1993).
- 17) Sato, R., Noguchi, T. and Naito, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 67-76(1986).
- 18) 阿佐美章治, 平塚静子, 北野隆雄, 江指隆年: *栄養誌*, **47**, 103-112(1989).
- 19) 後藤聡幸, 米原葉子, 土田 博, 桑田 有: *栄養誌*, **48**, 195-202(1995).
- 20) Evans, J.L. and Ali, R.: *J. Nutr.*, **92**, 417-424(1967).
- 21) Demigne, C., Levrat, M. and Remesy, C.: *J. Nutr.*, **119**, 1625-1630(1989)
- 22) Schulz, A.G.M., Amelvoort, J.M.M. and Beynen, A.C.: *J. Nutr.*, **123**, 1724-1731(1993).
- 23) Yanahira, S., Morita, M., Aoe, S., Suguri, T., Takada, Y., Miura, S. and Nakajima, I.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **43**, 123-132(1997).
- 24) Levrat, M., Remesy, C. and Demigne, C.: *J. Nutr.*, **121**, 1730-1737(1991).