

ラットのカルシウム吸収に及ぼす L 型発酵乳酸カルシウムの影響

岸本三香子*, 松浦 寿喜*, 植草 丈幸**, 原 高明**, 市川 富夫*
(*武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科, **株式会社ハクジュ・ライフサイエンス)

Effect of fermentation Calcium L-lactate on calcium absorption in rats

Mikako Kishimoto*, Toshiki Mathuura*, Takeyuki Uekusa**
Takaaki Hara** and Tomio Ichikawa*

**Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan
**Hakuju Life Science Co., Ltd. Tokyo 173-0004, Japan*

We investigated the effect of fermentation calcium L-lactate on the absorption of calcium in rats. Calcium carbonate was used as a source of calcium of control diet and fermentation calcium L-lactate was used as a source of calcium of test diet. Five-week-old rats were divided into two groups, one group was fed a control diet and another group was fed a test diet for 3 weeks. Both diets contained the same amounts of calcium(0.52%), phosphorus(0.40%)and magnesium(0.05%). Calcium absorption ratio, calcium retention ratio and the concentration of femur calcium of rats fed a test diets did not differ from a control diet group. The amount of femur calcium of rats fed a test diet was slightly higher than those of rats fed a control diet. These results suggest that the ingestion of fermentation calcium L-lactate was imagined to be valid for bony health.

緒言

カルシウム(Ca)の吸収には, Ca 源の違いによる吸収の差が考えられ, 以前から人間や実験動物などを用いてその有効性が論じられている. 一般に, Ca は腸管内で溶解しイオン化された後に小腸から吸収されるため, その Ca の溶解度が高いほど吸収性は良いとされている¹⁾. 近年では, Ca 溶解性を高める CPP^{2,3)}, CCM^{4,5)} が開発され, Ca の吸収促進効果が報告されている. Ca 塩においても同様に考えられ, Ca 源として使用されている炭酸 Ca, 乳酸 Ca, クエン酸 Ca, リン酸 Ca, グルコン酸 Ca などにも, より溶解度が高い塩に吸収促進効果があると報告がある⁶⁻⁸⁾. しかし Ca 塩の違いによ

る吸収には大きな差がない⁹⁻¹¹⁾とする報告もある. 本研究では, Ca 源に L 型発酵乳酸 Ca を用いて, ラットの Ca 吸収促進効果を検討した.

実験方法

1. 飼育飼料

飼料組成を Table 1. に示した. 蛋白質をカゼイン, 糖質をシュクロースおよびコーン澱粉, 脂質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. 対照飼料の Ca 源には炭酸 Ca を用い, 試験飼料の Ca 源には Ca 含有率 13.6% の L 型発酵乳酸 Ca を用いた. 飼料食は Ca 含量 0.52%, リン(P)含量 0.40%, マグネシウム(Mg)含量 0.05%とした. カゼイン, コーンスターチ, セル

Table 1. Composition of experimental diet. (g/100g diet)

	Ca carbonate	Ca L-lactate
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	15.0	15.0
Corn oil	5.0	5.0
Cellulose powder	5.0	5.0
Vitamin mix ¹⁾	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2
Salt mix ²⁾	3.5	3.5
KH ₂ PO ₄	1.75	1.75
CaCO ₃	1.3	—
Calcium L-lactate	—	3.82
Sucrose	46.9	44.4

¹⁾According to AIN-76 Vitamin mixture

²⁾According to AIN-76 Mineral mixture, without Ca, P sources Ca:0.52%, Mg:0.05%, P:0.40%

ロースパウダー、ミネラルミックス、ビタミンミックスはオリエンタル酵母社製を用いた。コーン油はナカライテスク社製を用い、その他の試薬は和光純薬社製を用いた。作製した飼料のCa, P, Mgの実測値の平均(%)は、炭酸Ca飼料0.51, 0.56, 0.02, L型発酵乳酸Ca飼料0.56, 0.62, 0.02であった。

2. 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±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。ラットを炭酸Ca飼料で1週間予備飼育した後、2群に分け以後3週間炭酸Ca飼料およびL型発酵乳酸Ca(以後、乳酸Caとする)飼料で飼育した。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、飼料摂取量は2~3日に1度測定した。Caの出納実験は、試験食開始6~9日(前期)、および試験終了前18~21日(後期)の各4日間実施した。ラットは炭酸Ca食群5匹、乳酸Ca食群6匹を用いた。飼育最終日に、ネブタール麻酔下の腹部大動脈よりヘパリン処理した注射器で脱血後、臓器および大腿骨を摘出した。血液は遠心分離により血漿を分離した。得られた血漿および臓器は測定に使用するまで-30℃で冷凍保存した。

3. 実験方法

3-1 血漿のCa, Mg, P濃度及びアルカリホスファターゼ活性の測定

血漿中Ca濃度の測定には、カルシウムC-テストワコー、Mg濃度はマグネシウムB-テストワコー、P濃度はホスファC-テストワコー、アルカリホスファターゼ活性測定はアルカリ性ホスファK-テストワコー(いずれも和光純薬工業(株))を使用した。

3-2 Ca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。糞は105℃で3時間乾燥後粉末とし、一定量を550℃の電気炉で17時間灰化し、1N塩酸に溶解したものを試料とした。尿は、尿をしみこんだ濾紙を2N塩酸で1時間抽出処理したものを試料とした。糞尿中のCa量は原子吸光光度法¹²⁾で測定した。Ca吸収率、およびCa体内保留率は次式により算出した。

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

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

3-3 大腿骨のCa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、骨長を測定した。Ca量は、左大腿骨を600℃で17時間灰化し灰化重量を測定した後、1N塩酸で溶解したものを原子吸光光度法で測定した。

3-4 盲腸内容物のpHおよび揮発性脂肪酸量の測定

盲腸内pHは盲腸内容物湿重量1gあたり10mlの蒸留水を加えpHメーターにて測定した。揮発性脂肪酸量は、盲腸内容物0.2gをエタノール1.8mlで抽出後、遠心分離し(3000rpm, 20min)得られた上清を試料とした。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。キャリアガスは窒素、分析温度260℃、カラム槽温度130℃、気化室検出温度260℃とした。

4. 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

1. 飼育期間中の体重の推移

飼育期間中の体重および食摂取量をTable 2.に示した。飼育開始体重は142~143gであり、3週間

Table 2. Effect of calcium L-lactate on body weight gain, food intake and efficiency.

	Ca carbonate	Ca L-lactate
Body weight		
Initial(g)	142.8±7.7	142.6±6.6
Final(g)	331.9±15.3	323.7±15.4
Food intake		
g/day	24.3±1.1	24.4±1.1
g/21day	509.8±24.1	512.5±22.7
Food efficiency	0.37±0.01	0.35±0.01*

Values are means±SD.

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

Table 3. Effect of calcium L-lactate on various organ's weights.

	Ca carbonate	Ca L-lactate
Kidney(g)	2.51±0.25	2.48±0.19
Spleen(g)	1.00±0.04	0.97±0.07
Liver(g)	16.62±1.58	15.81±1.91
Heart(g)	1.24±0.05	1.19±0.08
Lung(g)	1.44±0.04	1.32±0.05*
Cecum(g)	3.63±0.32	4.20±0.55

Values are means±SD.

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

Table 4. Effect of calcium L-lactate on Ca, Mg, P and Alkaline phosphatase activity(Alp) in plasma.

	Ca carbonate	Ca L-lactate
Ca(mg/dl)	10.0±0.9	10.2±1.0
P(mg/dl)	8.1±0.7	8.4±1.0
Mg(mg/dl)	1.6±0.2	1.6±0.2
Alp(K-A)	49.8±13.6	36.7±7.3

Values are means±SD.

飼育後の最終体重は、炭酸 Ca 食群、乳酸 Ca 食群ともに 330g 前後であり、両群間に差はみられなかった。また、飼育期間中の食摂取量にも差はみられなかった。しかし、乳酸 Ca 食群の食効率は、炭酸 Ca 食群と比較して有意に低値を示した。これは、乳酸 Ca 食群の若干低い体重と、若干高い餌摂取量によるものと推察された。

2. 臓器重量に及ぼす影響

腎臓、脾臓、肝臓、心臓、盲腸いずれの臓器にも差はみられなかった。肺は、乳酸 Ca 食群で有意に

Table 5. Effect of calcium L-lactate on the calcium balance in rats.

	Ca carbonate	Ca L-lactate
6-9 days		
Intake(mg/day)	124.5±14.9	140.2±14.6
Fecal excretion (mg/day)	50.5±8.8	64.5±9.2*
Urinary excretion (mg/day)	1.18±0.29	1.62±0.45
Absorption(%)	59.6±4.1	54.0±5.1
Retention(%)	58.6±3.9	52.9±5.0
18-21 days		
Intake(mg/day)	147.5±16.7	145.6±8.6
Fecal excretion (mg/day)	76.0±13.6	82.3±7.0
Urinary excretion (mg/day)	0.81±0.33	1.40±0.48*
Absorption(%)	48.8±4.1	43.4±4.6
Retention(%)	48.2±4.2	42.4±4.9

Values are means±SD.

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

Table 6. Effect of calcium L-lactate on wet weight, length, calcium content of left femur in rats.

	Ca carbonate	Ca L-lactate
Wet weight(g)	0.67±0.02	0.72±0.04*
Length(mm)	30.3±0.5	30.6±0.2
Ash weight(g)	0.21±0.01	0.22±0.01**
Ca content(mg)	76.1±4.5	83.1±3.3*
Ca(%)	36.8±2.2	37.0±0.7

Values are means±SD.

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

低値を示した(Table 3.)。

3. 血漿中の Ca, Mg, P 濃度及びアルカリホスファターゼ活性に及ぼす影響

血漿中 Ca, P, Mg 濃度および血漿中アルカリホスファターゼ活性に両群間に差はみられなかった(Table 4.)。

4. 出納実験

出納実験の結果を Table 5. に示した。前期(試験食開始 6-9 日)では、乳酸 Ca 食群は炭酸 Ca 食群と比較して、糞中 Ca 排泄量は有意に高値を示し、尿中 Ca 排泄量も高値傾向を示した。Ca 吸収率および体

内保留率は、乳酸 Ca 食群において低い傾向を示したが、統計的な差は見られなかった。後期(試験食開始 18-21 日)においても同様の傾向を示した。

5. 大腿骨に及ぼす影響

大腿骨に及ぼす影響を Table 6. に示した。大腿骨長には差は見られなかった。しかし、大腿骨重量および灰化重量は乳酸 Ca 食群が有意に高値を示した。また、大腿骨 Ca 量も有意に高値を示した。

6. 盲腸に及ぼす影響

盲腸に及ぼす影響を Table 7. に示した。乳酸 Ca 食群の盲腸内容物量は有意に高値を示した。盲腸壁、盲腸内 pH には差はみられなかった。盲腸内揮発性脂肪酸量では、乳酸 Ca 食群はプロピオン酸量が有意に高値を示したが、酢酸量、酪酸量には差はみられなかった。

Table 7. Effect of calcium L-lactate on pH, weight and short chain fatty acid composition of the cecal contents.

	Ca carbonate	Ca L-lactate
Weight(g)	3.63±0.32	4.20±0.55
Cecum wall(g)	1.38±0.22	1.32±0.25
Weight of contents in the cecum(g)	2.24±0.34	2.88±0.52*
pH	7.35±0.54	7.92±0.07
Short chain fatty acid(mg/cecum/rat)		
Acetic acid	2.22±0.51	2.79±0.60
Propionic acid	1.02±0.20	1.41±0.26*
Butyric acid	1.08±0.29	1.14±0.25
Total VFA	4.33±0.90	5.34±1.07

Values are means±SD.

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

考 察

Ca の吸収利用性には、Ca の溶解性が重要な要因であることが知られている。Ca は体内で溶解しイオン化された後に小腸から吸収されるため、その Ca の溶解度が高いほど吸収性は良いと考えられる。投与 Ca 塩の形態においても、より溶解度が高い塩に吸収促進効果があるとする報告がある⁶⁻⁸⁾。一方 Ca 塩間においては、通常の状態においては Ca 塩の違いによる吸収に大きな差がないことも報告されており⁹⁻¹¹⁾、Ca 塩の違いによる Ca 吸収効果は他の要因も考えられ、明らかにされていない。乳酸 Ca は有機酸の Ca 塩の中でも溶解度が高く、また今回

用いた L 型は、合成(DL 型)乳酸 Ca と比較しても 1.8 倍もの高い溶解度を示す。動物の体内で作られる乳酸と同じ L 型であることから、Ca の吸収促進性が期待された。今回得られた結果では、乳酸 Ca 食の Ca 吸収率、および体内保留率は炭酸 Ca 食と比較して差はみられなかった。しかし、乳酸 Ca 食による大腿骨の重量および Ca 量は有意に高値を示した。Tsugawa ら¹¹⁾は Ca 塩の違いが骨ミネラル、強度に及ぼす影響を検討しているが、炭酸 Ca、DL-乳酸 Ca、L-乳酸 Ca 間には差はみられなかったとしている。Ca 吸収促進実験では、Ca 源のみならず、実験動物の週齢、性別、飼料組成など、様々な要因が影響する。しばしば、Ca の生物利用効果は、より効果を明らかにする目的で、Ca 欠乏状態のラットを用いて研究がなされている。Hamalainen ら⁸⁾は低 Ca 状態において、乳酸 Ca の骨有効性を示している。今回我々が使用した飼料の Ca 濃度は 0.52% であり、Ca 摂取量としては十分な量を設定しているが、今回の結果では、L 型乳酸 Ca の骨への有効性が若干ではあるが示唆された。

難消化性糖摂取による、大腸でのミネラルの吸収促進効果が報告されている¹³⁻¹⁵⁾。小腸で消化されなかった糖が下部消化管に達し、腸内細菌により産出された揮発性脂肪酸による効果が示されている。今回の実験では、乳酸 Ca 食摂取により、盲腸が若干肥大傾向にあり、揮発性脂肪酸量も増加傾向にあった。乳酸 Ca の体内での溶解性は明らかではなく、腸内への影響も明らかではないが、腸内環境の改善は認められた。

Ca の生物利用効率は、腸管からの吸収率、骨中への取り込み量により判断される。本研究で得られた結果から、乳酸 Ca 食により出納実験からは Ca 吸収促進効果は認められなかったが、大腿骨 Ca 量の増加により骨への有効性が認められた。また、腸内環境の改善が認められた。

要 約

本研究は、Ca 源として L 型発酵乳酸 Ca を用いた場合の、ラットの Ca 吸収に及ぼす影響を検討した。

5 週齢 SD 系雄ラットを 2 群に分け、炭酸 Ca 飼料および L 型発酵乳酸 Ca 飼料で 21 日間飼育した。飼育期間中に 2 回の出納実験を行い、Ca 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 Ca 含有量を測定した。出納実験からは L 型発酵乳酸 Ca 食による Ca 吸収促進効果は認められなかった。L 型発酵乳酸 Ca 食による大腿骨の Ca 量は有意に高値を示しており、骨への有効性が示唆された。また、揮発性脂肪酸量も増加傾向にあることから、腸内環境の改善が認められた。L 型発酵乳酸 Ca により、ラット大腿骨および盲腸への有効性が認められた。

文 献

- 1) Levenson, D.I. and Bockman, R.S., *Nutrition Reviews.*, **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**, No.4, 333-338(1992)
- 4) Haney, 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) Spencer, H. Scheck, J. Lewin, I. and Samachson, J., *J. Nutr.*, **89**, 283-2-2(1966)
- 7) Harvey, J.A. Zobitz, M.M. and Pak, C.Y., *J. Bone. Miner. Res.*, **3**, 253-258(1988)
- 8) Hamalainen, M.M., *J. Nutr.*, **124**, 874-881 (1994)
- 9) Patton, M.B. and Sutton, T. S., *J. Nutr.*, **48**, 443-(1952)
- 10) Greger, J.L., Krzykowski, C.E., Khazen, R.R., and Krashoc, C.L., *J. Nutr.*, **117**, 717-724(1987)
- 11) Tsugawa. N., Okano, T., Higashino, R., Kimura, T., Oshio, Y., Teraoka, Y., Igarashi, C., Ezawa, I., and Kobayashi, T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 677-682(1995)
- 12) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之, 食品分析ハンドブック, 建帛社, 東京, p.281-283(1982)
- 13) Wasserman, R.H., Comar, C.L., and Nold, M.M., *J. Nutr.*, **59**, 371-383(1956)
- 14) Goda., T., Yamada, M., Takase, S., and Hosoya, N., *Nutr. Sci. Vitamonol.*, **38**, 277-286(1992)
- 15) Brommage, R., Binacua, C., Antille, S., and Carrie, A., *J. Nutr.*, **123**, 2186-2194(1993)