

大腸内フローラパタンの決定づけに及ぼす離乳後の 大豆たん白質摂取の影響

西村直道・濱田佳穂莉・山本達朗

名寄市立大学保健福祉学部

Effects of Soy Protein Isolate on Cecal Fermentation and Microbiota Patterns in Weaning Rats

Naomichi NISHIMURA, Kahori HAMADA and Tatsuro YAMAMOTO

Faculty of Health and Welfare Science, Nayoro City University, Hokkaido 096-8641

ABSTRACT

To clarify the hypothesis that the administration of different proteins after weaning modifies the intestinal microbiota and fermentation, we examined the effect of soy protein isolate (SPI) on cecal fermentation and microbiota patterns in weaning rats. Female rats were fed a casein diet during gestation and lactation. After lactation for 21 d, litters were fed the casein and SPI diets for 3, 7, 14, 21 and 28 d in experiment 1, and for 7 and 21 d in experiment 2. In experiment 2, for the subsequent 7 and 14 d the diets were reversed. Cecal microbiota and cecal short chain fatty acid concentration were determined. According to 16S rDNA PCR-DGGE analysis, feeding the pups with SPI resulted in new clusters of cecal microbiota on at least d 7 after weaning compared to the casein-fed pups. After 21 d post-weaning, the microbiota patterns were similar. Cecal butyrate concentrations in the SPI-fed pups were greater than in the casein-fed pups after 7 d post-weaning, and were stable after 21 d post-weaning. In experiment 2, high cecal butyrate concentrations in SPI-fed pups decreased for 14 d after diet switching. In conclusion, when pups are fed SPI as a protein source, cecal microbiota patterns different from those in casein-fed pups are formed. The administration of SPI to weaning pups promotes cecal butyrate production. However, this effect disappears if other protein is fed. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 94-99, 2009.

Key words : soy protein isolate, fermentation, microbiota, weaning, rats

離乳後の食事は大腸内細菌叢のパタン形成に強く影響し、その後の個体特有の細菌叢パタン定着に寄与する。細菌叢パタンの違いは異なる大腸内発酵パタンを生ずる。大腸内細菌および発酵産物は大腸粘膜にさまざまな作用を示し、大腸がんなどの大腸疾病発症²⁻⁴⁾や肥満発症¹⁾にかかわっていることが近年報告されている。特にlactobacilliや酪酸は大腸粘膜の正常化に寄与していると考えられている。このことから、離乳直後に摂取する食事の成分を制御することによって有用菌の定着を促し、有用発酵産物を増加させ、健全な大腸内環境を構築することが生活習慣病予防に重要であると考えられる。

本申請者らは、大豆難消化性たん白質をラットに与えると、ある種の細菌種の活性化を通じ、大腸で酪酸発酵が亢進することを見出した⁶⁾。また、Moritaらも難消化性たん白質の投与がハイアミロースコーンスターチの発酵を変動させ、生成する短鎖脂肪酸のパタンを変えることを示している⁵⁾。離乳直後のラットの消化管構造や消化吸収は未熟であり、大腸内に流入する未消化たん白質は多い。さらに、大豆たん白質(SPI)は動物性たん白質に比べ、比較的消化率が低い。したがって、離乳後にSPIを摂取すると、大腸内に流入する窒素源が増加し、特定の腸内細菌の増殖・定着を促進すると予想される。この結果、腸内細菌叢パタンを決定づけ、有用な大腸内発酵環境を実現できると考えられる。

そこで本研究では、SPIを離乳後の仔ラットに与えたときの大腸内細菌叢パタンの変動と有用菌と考えられている乳酸菌量の変動を明らかにすることを目的とした。また、細菌叢の変動に伴う大腸内発酵の変動を調べた。

方 法

たん白質源

試験たん白質としてカゼイン (ACID CASEIN, Murry Goulburn Co-operative Co. Ltd.), 分離大豆たん白質 (フジプロ, 不二製油(株)) を用いた。

実験1：離乳後のSPI摂取が腸内細菌叢および大腸内発酵に与える影響

Sprague-Dawley (SD) 系妊娠ラット (妊娠11日目) 7匹をカゼイン飼料 (AIN-93に準拠, Table 1) で飼育し、出産させ、仔ラットに授乳させた。生後21日目に仔ラットを強制離乳し、それぞれの母ラットの同腹仔を2群に分け、カゼイン飼料もしくはSPI飼料を与えた。母ラットは強制離乳時にネンブータル麻酔下で解

Table 1. Composition of the experimental diets

Ingredients	g/kg	
	Control diet	SPI diet
Casein	250	—
SPI	—	250
Corn starch	482.5	482.5
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
Mineral mixture (AIN-93G)	35	35
Vitamin mixture (AIN-93)	10	10
Cellulose	50	—
Choline bitartrate	2.5	2.5

剖し、盲腸内容物を採取した。仔ラットはそれぞれ強制離乳時、離乳3, 7, 14, 21, 28日後に麻酔下で解剖し、ただちに盲腸内容物を得た。

実験2：離乳後のSPI摂取により形成された大腸内発酵パタンの安定性

Sprague-Dawley (SD) 系妊娠ラット (妊娠13日目) 7匹をカゼイン飼料 (AIN-93に準拠) で飼育し、出産させ、仔ラットに授乳させた。生後21日目に仔ラットを強制離乳し、それぞれの母ラットの同腹仔を2群に分け、カゼイン飼料もしくはSPI飼料を与えた。離乳21日後から飼料をクロスオーバーさせ、さらに14日間飼育した。母ラットは強制離乳時にネンブータル麻酔下で解剖し、盲腸内容物を採取した。仔ラットはそれぞれ強制離乳時、離乳7, 21, 28, 35日後に麻酔下で解剖し、ただちに盲腸内容物を得た。

分析

短鎖脂肪酸は高速液体クロマトグラフィーで測定した。腸内細菌叢パタンは盲腸内容物中の腸内細菌よりDNAを抽出し、16S rDNAの特異的領域を増幅した後に、PCR-DGGE (変性グラジエントゲル電気泳動) 法で解析した。細菌DNAの抽出は、ISOFEAL for Beads Beating (ニッポンジーン) を用い、マルチビーズショッカー (安井器械) でビーズ破碎 (2700 rpm, 90 sec) して行った。PCRは、94℃, 2 min, 1 cycle; 94℃, 30 sec, 56℃, 30 sec, 72℃, 60 sec, 30 cycle; 72℃, 7 min, 1 cycleの条件で行った。プライマーは、HDA1-GC, 5'-CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGC GGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCA GT-3'; HDA2, 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' を用いた。DGGEは変性剤濃度勾配を30 ~ 55% (100% 変性剤: 7 mol/L尿素 + 40%ホルムアミド) の8%アクリルアミドで、130 Vで6時間泳動した。温度は60℃で実施した。泳動後にエチジウムブロマイドで染色し、UV照射により検出した。バンドパタンの類

似度はQuantity One (Bio-Rad社) を用いて算出し、UPGMA法でクラスター解析を行った。

lactobacilliおよびbifidobacteria数は上記の盲腸内容物から得た細菌DNAを用いて定量的PCR法でSYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ(株))を用いて解析した。プライマーとしてlactobacilliの定量には, LactoF, 5'-TGGAAACAGRTGCTAATACCG-3', LactoR, 5'-GTCCATTGTGGAAGATTCCC-3'を, bifidobacteriaの定量には, g-Bifid-F, 5'-CTCCTGGAAACGGGTGG-3', g-Bifid-R, 5'-GGTGTCTCTCCCGATATCTACA-3'を用いた。lactobacilliの定量に用いたPCR条件は, 94℃, 20 sec, 1 cycle; 94℃, 20 sec, 60℃, 30 sec, 40 cycles, bifidobacteriaの定量のそれは, 94℃, 20 sec, 1 cycle; 94℃, 20 sec, 55℃, 20 sec, 72℃, 50 sec, 40 cyclesとした。lactobacilliとbifidobacteriaの菌数は, *Lactobacillus acidophilus* (JCM 1132) と

Bifidobacterium breve (JCM 1192) の16S rDNAを組み込んだプラスミドを標準として, コピー数より算出した。

統計処理

実験結果は一元分散分析により検定し, 有意差が認められた場合, Student *t*-検定により検定した。有意水準は $p<0.05$ とした。

結 果

実験1：離乳後のSPI摂取が腸内細菌叢および大腸内発酵に与える影響

Fig. 1に盲腸内細菌叢を示した典型的なDGGE像とそのバンドパターンをクラスター解析して得られた樹形図を示した。同腹仔の腸内細菌叢を比較すると, 離乳3日後までたん白質源の違いによる影響がみられなかった。離乳7日後以降, カゼインとSPIを与えた仔

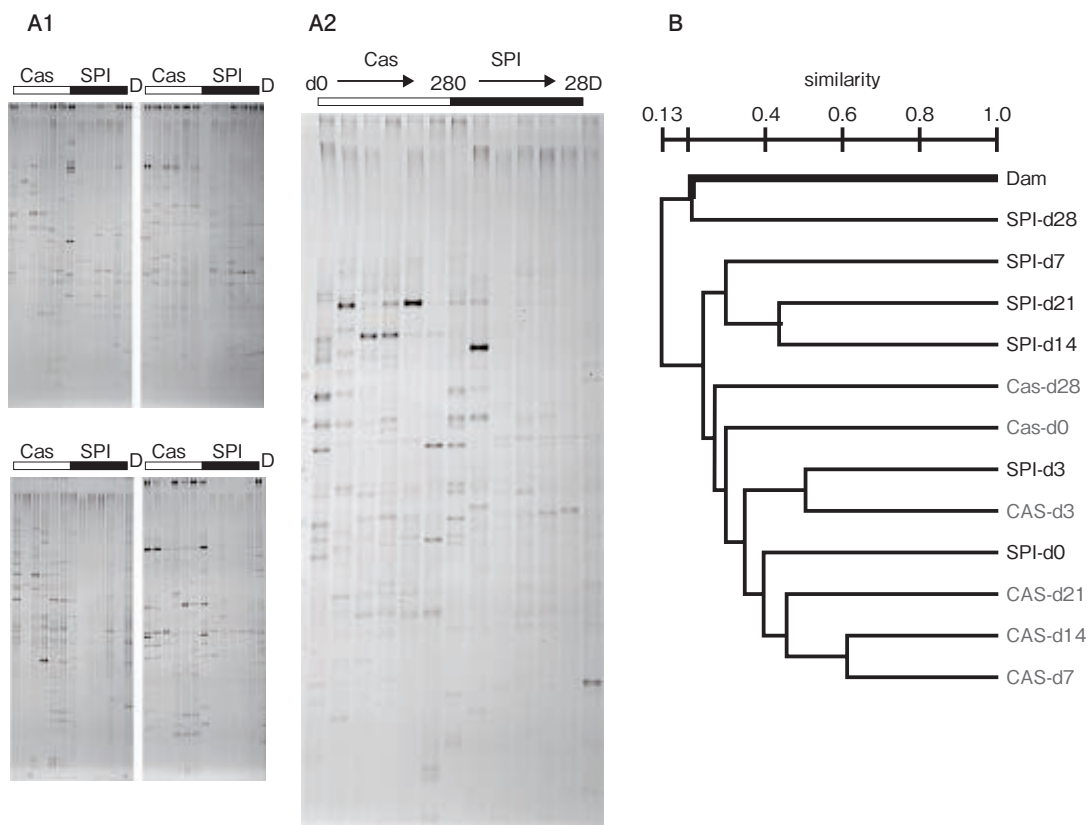


Fig. 1. Effect of SPI on cecal microbiota in weaning rats. (A1 and A2) Banding patterns of 16S rDNA polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) in cecal content from weaning litters fed the casein and SPI diets. (B) Dendrogram representing casein and SPI-associated correlations of PCR-DGGE banding patterns (Fig. 1-A2) in cecal content from litters fed the casein and SPI diets. D, dam.

ラットの腸内細菌叢パターンは違うクラスターを形成した。離乳14日後もしくは21日後には腸内細菌叢パターンはほぼ安定した。

離乳後28日間、SPI投与仔ラットの盲腸内lactobacilli数は母ラットのそれとほぼ同等であった (Fig. 2)。カゼイン投与仔ラットの盲腸内lactobacilli数は一時的に減少したが、離乳28日後にSPI投与仔ラットのそれと同等となった。一方、離乳28日後のbifidobacteria数はカゼイン投与仔ラットよりSPI投与仔ラットで有意に低くなった。

Fig. 3に盲腸内短鎖脂肪酸濃度の変化を示した。酢酸、プロピオン酸および酪酸の盲腸内濃度はいずれも、離乳後のSPI投与によってカゼイン投与よりも有意に高かった。特にSPI投与仔ラットの酪酸濃度は離乳7日後から28日後までカゼイン投与仔ラットより有意に高値を示した。また、この酪酸濃度は離乳21日後以降ほぼ安定した。

実験2：離乳後のSPI摂取により形成された大腸内発酵パターンの安定性

Fig. 4に離乳後の盲腸内短鎖脂肪酸濃度の変化を示した。離乳21日後までSPI投与仔ラットの酪酸濃度は、実験1同様カゼイン投与仔ラットのそれより有意に高かった。しかし、離乳21日後に飼料をクロスオーバーさせると、離乳35日後の酪酸濃度は逆転した。酢酸およびプロピオン酸濃度は離乳21日後まで2群間に有意な差はなく、飼料のクロスオーバー後にこれらの濃度は顕著に変動した。

考 察

以前に我々は大豆難消化性たん白質を与えたときある種の細菌種の活性化を通じ、大腸で酪酸発酵が亢進することを見出した⁶⁾。SPIはカゼインより消化率が低い。また、離乳後の仔ラットのたん白質消化率は低い。また、SPI投与仔ラットの盲腸内に流入した未消化窒素が多くなると考えられる。本研究においてSPI仔ラットで、短鎖脂肪酸の中でも特に酪酸濃度が著しく増加した。この結果は難消化性大豆たん白質投与による酪酸生成の増加と一致する⁶⁾。したがって、SPIの未消化画分が大腸に流入し、酪酸生成の促進に寄与していると考えられる。また、Moritaらも、発酵基質として糖

質を大腸に過剰に供給するときに、同時に窒素を大腸に供給すると細菌増殖を助け、正常な発酵となることを明らかにしている⁵⁾。これらの結果は、窒素源が大腸発酵の制御に重要な因子であることを示している。離乳後に仔ラットにたん白質源としてSPIを与えると、カゼインを与えた場合とは異なる腸内細菌叢パターンが形成されることも明らかとなった。また、このパターン形成の安定化に21日程度必要であることが示された。一方、離乳後のSPI投与による盲腸内酪酸濃度の安定化にも離乳後21日程度必要であることが示された。以上より、離乳後SPIを投与は大腸内細菌叢のパターンに影響を与え、酪酸生成を促進することが示唆される。

実験2で離乳直後のSPI投与によって形成された盲腸内発酵パターンが、その後の他のたん白質摂取によって安定なままであるかを調べた。Fig. 4に示したように、たん白質源を異なるものに変えるとSPI投与時に認められた高酪酸生成能は消失した。一方、たん白質源をカゼインからSPIに切り替えた場合、酪酸生成能が高くなった。この結果、SPIが存在しなければ、酪酸生成能が高く維持されないことが明らかとなった。しかし、離乳21日後までの酢酸濃度やプロピオン酸濃度は両たん白質投与仔ラット群で顕著な違いがみられなかったにも関わらず、たん白質源を切り替えた後の各濃度に変動が生じた。この結果はそれぞれのたん白源投与仔ラットに固有の腸内細菌叢が形成されたため、異なるたん白質源が流入したときに短鎖脂肪酸濃度の変動として現れたと思われる。以上より、離乳直後にSPIを与えた場合、カゼインを与えた場合と比べ腸内細菌叢パターンが異なり、たん白質を切り替えた後も大腸内発酵に影響を与えると考えられる。

以上をまとめると、離乳直後にたん白質源としてSPIを与えると、カゼインを与えたときと異なる腸内細菌叢パターンを形成すると思われる。また、離乳仔ラットへのSPIの投与は盲腸内酪酸生成を亢進させるが、他のたん白質導入によりその作用は消失することが示唆された。しかしながら、離乳直後にSPIを与えることで定着する腸内細菌叢は異なることが推察された。今後、離乳直後のSPI投与による大腸内環境に与える影響についてさらに詳細に検討を重ねていく必要がある。

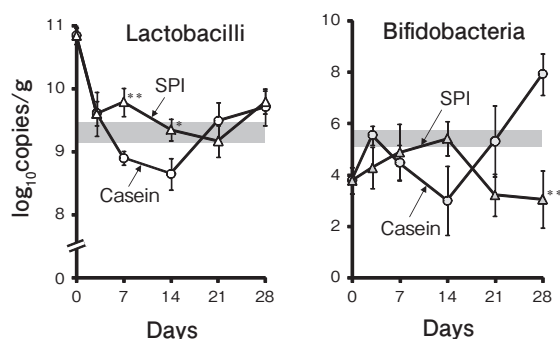


Fig. 2. Change in the number of lactobacilli and bifidobacteria in cecal content in weaning rats fed the casein and SPI diets. Each point is the mean of 7 rats; vertical bars represent SEM. *, **, ***C and SPI differ, $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively. Statistical comparisons were made with Student's *t*-test. Gray areas indicate the number (mean $\pm$ SEM) of lactobacilli and bifidobacteria in cecal content in dams ($n=7$). SPI, soy protein isolate.

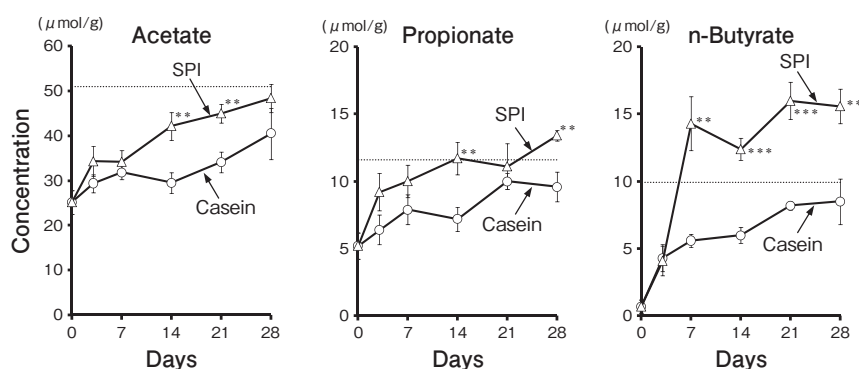


Fig. 3. Change in the concentration of cecal short-chain fatty acids in weaning rats fed the casein and SPI diets. Each point is the mean of 7 rats; vertical bars represent SEM. *, **, ***C and SPI differ, $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively. Statistical comparisons were made with Student's *t*-test. Dot lines indicate the mean cecal acetate, propionate and n-butyrate concentration in dams ($n=7$). SPI, soy protein isolate.

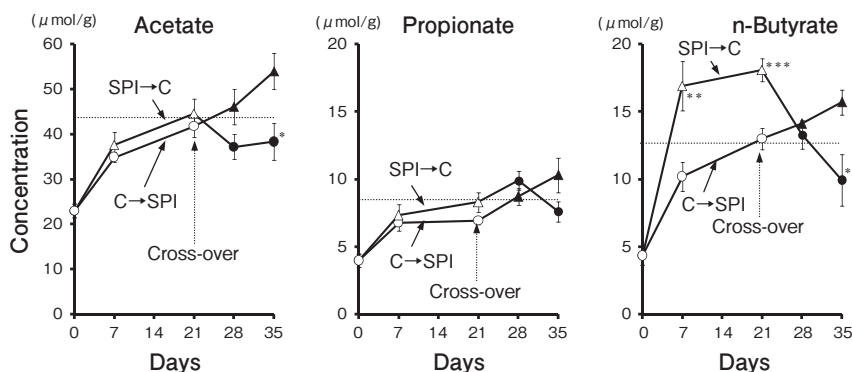


Fig. 4. Change in the concentration of cecal short-chain fatty acids in weaning rats fed the casein and SPI diets. Diets were exchanged on d 21. Each point is the mean of 7 rats; vertical bars represent SEM. *, **, ***C and SPI differ, $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively. Statistical comparisons were made with Student's *t*-test. Dot lines indicate the mean cecal acetate, propionate and n-butyrate concentration in dams ($n=7$). SPI, soy protein isolate.

要 約

離乳後に与えるたん白質が腸内細菌叢や大腸内発酵に与える影響を明らかにするため、離乳後の仔ラットにSPIを与えたときの腸内細菌叢パターンおよび大腸内発酵の変動について調べた。妊娠期間および授乳期間中、ラットにカゼイン（C）食を与えた。出生21日後に仔ラットを強制離乳させ、同腹仔を6匹ずつ2群に分け、実験1ではC食およびSPI食を与え、実験2では離乳21日後までC食およびSPI食を与えた後、飼料をクロスオーバーさせてさらに14日間飼育した。試験開始時に母ラットと仔ラットを、試験食投与途中に仔ラットを解剖した。盲腸内容物中の腸内細菌叢パターンおよび短鎖脂肪酸濃度を解析した。SPI食群の腸内細菌叢パターンはC食群と異なる新たなクラスターを離乳7日後以降形成し、離乳21日後にはその菌叢がほぼ安定した。SPI投与仔ラットの盲腸内酪酸濃度はC食群のそれに比べ有意に高く、離乳21日後ではほぼ一定となった。また、離乳直後のSPI投与による酪酸生成亢進作用は、カゼイン食に切り換えることで消失した。以上より、たん白質源として離乳直後の仔ラットにSPIを与えると、カゼイン食投与仔ラットと異なる腸内細菌叢パターンを形成すると思われる。また、離乳仔ラットへのSPIの投与は盲腸内酪酸生成を亢進させるが、他のたん白質導入によりその作用は消失することが示唆された。

文 献

- 1) DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA and Rittmann BE (2008): Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*, **83**, 460-469.
- 2) Goldin BR and Gorbach SL (1980): Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J Natl Cancer Inst*, **64**, 263-265.
- 3) Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Esterman A and Young GP (2007): Suppression of azoxymethane-induced colon cancer development in rats by dietary resistant starch. *Cancer Biol Ther*, **6**, 1621-1626.
- 4) Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C and Gonzalez F (1998): Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **22**, 14-17.
- 5) Morita T, Kasaoka S, Ohhashi A, Ikai M, Numasaki Y and Kiriama S (1998): Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. *J Nutr*, **128**, 1156-1164.
- 6) 西村直道, 三田由紀, 櫻井麻衣子, 山本達朗, 太田 徹 (2007): 大豆たん白質難消化性画分による大腸内フローラの変動解析. 大豆たん白質研究, **10**, 48-54.