

腸内腐敗物産生に及ぼすたん白質の種類の影響

久田 孝*

東京海洋大学大学院海洋科学系食品微生物学研究室

Effects of Dietary Proteins on Putrefactive Compound Production in the Intestine

Takashi KUDA*

Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology,
Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo 108-8477

ABSTRACT

Edible brown algae and soy-beans are used as major food materials in Far East Asian countries, particularly in South Korea and Japan. Brown algae contain fermentable dietary fibers, alginic acid (uronic acid polymer) and laminaran (β -1,3-glucan), that are fermented into organic acids by intestinal bacteria. In our previous study, high concentrations of soy-protein in the diet induced the putrefactive compounds indole, H₂S and phenol. The inhibitory effects of laminaran and alginate on the formation of ammonia, indole compounds and phenol compounds, putrefactive and harmful compounds, induced from soy-protein by human fecal microflora, were examined *in vitro*. Laminaran was fermented to lactate about 4 mmol/L. Compared with a control culture without dietary fiber, alginate increased acetate and propionate. Although both of these polysaccharides inhibited formation of the putrefactive compounds, the inhibitory effect of laminaran was higher. Rats were fed a diet containing 20% (w/w) soy-protein and 2% (w/w) laminaran or alginate. Laminaran increased cecal lactic acid content about two times and lowered pH from 7.3 to 6.3. Laminaran suppressed about 50% of indole production in the cecum. Alginate also suppressed cecal indole and phenol. These results suggest that both the fermentation and physical properties of laminaran and alginate correlated with their inhibitory effects against accumulation of the putative risk markers for colon cancer. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 52-57, 2014.

Key words : soy protein, intestinal putrefactive compounds, laminaran, alginate:
brown algae

* 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

成人の大腸内には500種類以上の細菌類が10～100兆個も存在しており、その代謝産物が宿主に影響することが知られている。例えば、アンモニアやフェノール、インドールなどのいわゆる腐敗産物は腫瘍リスクの一部と考えられており、その代謝産物は、通常の生活においては、食餌成分によって大きく変動する^{1,2)}。われわれはこれまでに、食餌成分の違いが腸内発酵や腐敗物質の濃度に及ぼす影響を検討してきた^{3,4)}。食物繊維は腸内用物のカサを増やし、腐敗物質を排泄するため、腸内用物の濃度は低くなる。また、腸内フローラによって発酵される場合、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸や乳酸などが増加し、腐敗物質を産生する腸内腐敗菌が抑制されると考えられる。

小動物の実験でよく用いられる準合成飼料のAIN76のたん白源はミルクカゼインであるが、これを大豆たん白質に置き換えた飼料をラットに与えた場合、盲腸内において腐敗産物、特にインドールおよびフェノールが顕著に増加することを確認した (Fig. 1)⁵⁾。日常の調理に用いられる食材は丸大豆や大豆粉などで、食物繊維その他を含んでいるため、大豆そのものの摂取で腐敗産物が増加するとは限らないが、加工品用の材料として大豆たん白を多く含む製品の場合には考慮が必要と考えられる。

コンブやワカメ、ヒジキ、モズク、ホンダワラ類など多くの種類の食用褐藻類があるが、これらは和食文化において古くから大豆とともに食されてきた食材である。本研究においては、大豆たん白質の存在によるインドールなど腐敗産物の増加を再確認した。また、腸内環境を改善すると予想される食物繊維のうち、褐藻類中に含まれる水溶性多糖類のラミナラン (β 1,3をメインとして β 1,6結合を含むグルカン) およびアルギン酸 (マンヌロン酸とグルロン酸のポリマー)⁶⁾ の腐敗産物抑制効果を調べた。

方 法

ヒト糞便培養実験

GAM糖分解用半流動培地 (ニッスイ) を蒸留水で4倍に希釈し、寒天を取り除き、食塩を0.65%添加した培地 (GAM1/4培地) に大豆たん白質3% (w/v) およびラミナラン (東京化成) またはアルギン酸 (和光純薬) を1% (w/v) 添加した。試験培地にヒト糞便10倍希釈液を接種し、37°Cで48 h嫌気培養した。培養液中のインドールはKovac'sの試薬⁵⁾を用いて、フェノール (4-アミノアンチピリン法) およびアンモニア (インドフェノール法) は水質測定用試薬セット (No.7,

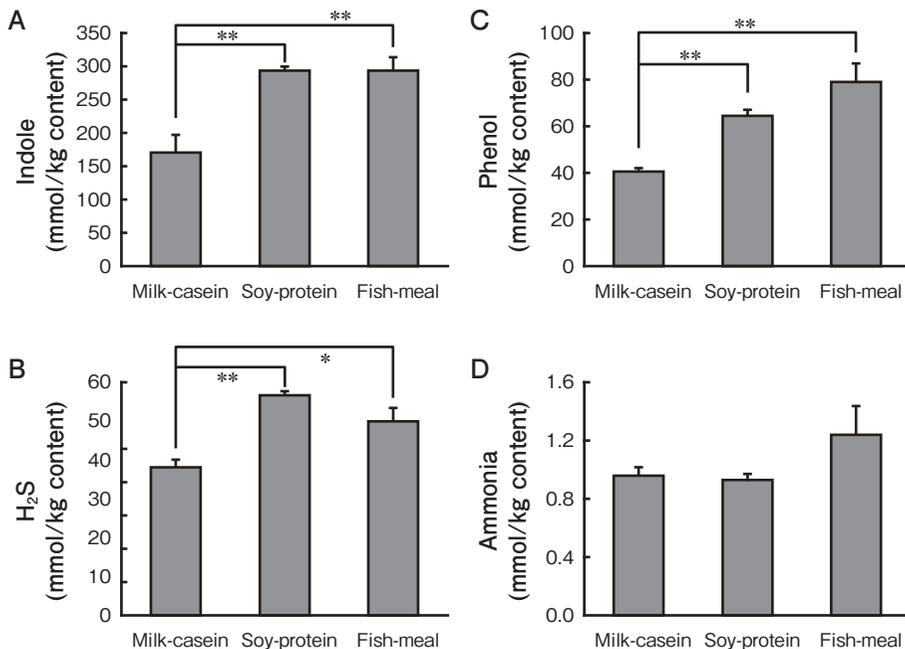


Fig. 1. Caecal putrefactive compound levels in rats fed diets containing 20%, w/w milk casein, soy protein or fish meal. Putrefactive compounds indole (A), H₂S (B), phenol (C) and ammonia (D). Values are expressed as means \pm SEM ($n=6$). * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

No.17A, 共立理化学研究所) を用いて, 吸光度測定にはマイクロプレートリーダーを用いた。また, 発酵の指標としてpHをpH電極 (Twin pH B-211, 堀場製作所) で測定し, 有機酸組成をHPLC法で分析した。HPLCの条件は以下のとおり: カラム: ICSep ICE-ORH-801 (Transgenomic); カラム温度: 35 °C, 溶媒: 0.05 mol/L 硫酸; 流速: 0.8 mL/min; 検出: 示差屈折系 (RI)。

ラット盲腸内環境

AIN-76のカゼイン20% (w/w) を大豆たん白質 (不二精油) に置き換えた食餌に, ラミナランおよびアルギン酸を2% (w/w) 加えた餌 (Table 1) をラットに15日間自由摂取させ, 盲腸内容物のpH, 腐敗産物および有機酸を上記と同様に測定した。また, 盲腸内フローラの変動を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) 法⁷⁾ で確認した。

Table 1. Composition of test diets

	Control	Alginate	Laminaran
Sucrose	50.0	50.0	50.0
Soy protein	20.0	20.0	20.0
Corn starch	20.0	18.0	18.0
Sodium alginate		2.0	
Laminaran			2.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0
AIN-76 mixed minerals	3.5	3.5	3.5
AIN-76 mixed vitamins	1.0	1.0	1.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2

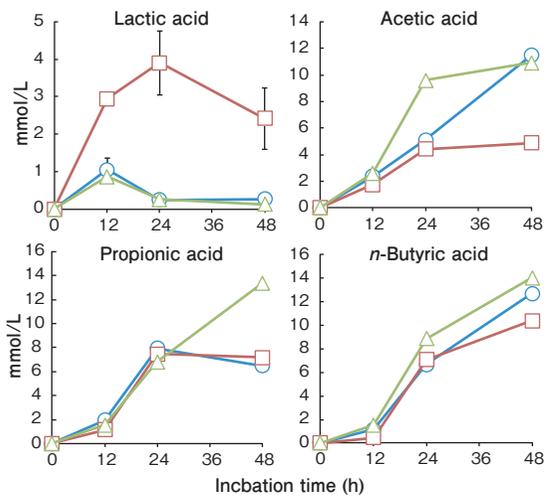


Fig. 2. Organic acid contents in the human fecal culture with no added carbohydrate (○), laminaran (□) or alginate (△) at 12, 24 and 48 h of incubation. Values are means and SEM (n=3).

DGGE

盲腸内容物からゲノムDNA抽出を行った。採取したDNAをテンプレートとし, 16S rDNAのV3領域をターゲットとしてPCR増幅を行った。尿素とホルムアミド30%から60%の変性剤濃度勾配を施した8%ポリアクリルアミドゲルを作製し, 1×TAE bufferの中に入れ, 60°C, 200 V, 150 mA, 180分間の条件下で電気泳動を行った。PCR産物は10×loading buffer (Takara Bio) と混ぜ, 30 μLずつアプライした。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し, 泳動写真を撮影した。

結果と考察

ヒト糞便培養液

今回の実験において, ヒト糞便培養液中にラミナランが存在した場合, 乳酸が顕著に増加したが, 酢酸, *n*-酪酸濃度は対照群よりも低かった (Fig. 2)。一方, アルギン酸の存在で培養24時間後の酢酸, および培養48時間後のプロピオン酸が増加し, *n*-酪酸もわずかに増加した。ヒト腸内フローラによる発酵パターンが異なるため, それぞれの多糖類を資化する菌種も異なると考えられる。

上記の総有機酸量はラミナランとアルギン酸で大きな違いはなかったが, pHの低下はラミナランで顕著であった (Fig. 3)。アンモニア, フェノールおよびインドールの産生はそれぞれの多糖類によって減少したが, アンモニアおよびインドールはラミナランによってより顕著に抑制された。これらの結果は, 以前尿素を加えた培地で検討した報告と一致している³⁾。

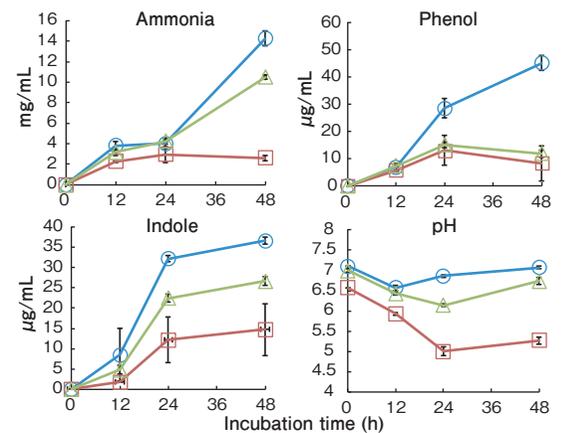


Fig. 3. Putrefactive compounds in the human fecal culture with no added carbohydrate (○), laminaran (□) or alginate (△) at 12, 24 and 48 h of incubation. Values are means and SEM (n=3).

ラット盲腸内環境

ラットを各試験食で15日間飼育した場合、体重増加量に有意差はなかったが、2%アルギン酸食で低い傾向であった (Table 2)。内容物を含めた盲腸の重量は2%ラミナランによって顕著に増加していた。盲腸内容物pHはラミナランによって顕著に低下しており、*in vitro* ヒト糞便培養試験の結果と一致していた。盲腸容積の増大は発酵性食物繊維を投与したときの特徴である。アルギン酸食でも盲腸容量は増大していたが、pHの明確な低下は認められなかった。糞便回数および重量は特にアルギン酸食で増加しており、排泄が促進されることが示された。

盲腸内容物のラミナランの摂取により乳酸が増大しており、ヒト糞便培養試験と一致していた (Fig. 4)。一方、その他の有機酸の違いは認められなかった。測定した腸内腐敗産物のうちインドールはラミナラン食群とアルギン酸食群の両方で有意な減少がみられ (Fig. 5)。アルギン酸食群ではフェノールにも有意な

Table 2. Body weight, cecal weight, cecal pH and fecal weight

	Control	Laminaran	Alginate
Initial body weight (g)	124.0±2.3	123.8±1.8	124.1±1.9
Final body weight (g)	262.5±4.7	266.2±2.9	235.5±4.1
Cecal weight (g)	2.62±0.15	5.39±0.78**	4.48±0.16*
Cecal pH	7.3±0.1	6.3±0.2**	7.2±0.3

Feces

Numbers (numbers/day/rat)	13.3±0.64	17.0±1.2*	25.3±0.67**
Weight (g/day/rat)	0.77±0.32	1.00±0.31*	1.19±0.57**

Each value is expressed as the mean ± SE (n=6). Difference from Control group, *p<0.05, **p<0.01.

減少が確認された。*In vitro*ではラミナランがより顕著に腐敗物産生を抑制したが、ラットではアルギン酸のほうが抑制したのは、*in vivo*では排泄促進効果によって腐敗産物濃度の減少が関連していると考えられる。両方の多糖類でアンモニアの濃度に有意な差がみられなかったが、pHが低い場合腸管壁からのアンモニア吸収が抑制されると考えられている³⁾。

DGGE法によってラット盲腸内のフローラを調べた結果、コントロール食群に比べ、ラミナラン食群とアルギン酸食群では異なるバンドパターンを示した (Fig. 6)。各バンドの切り出しと同定は現在進行中である。

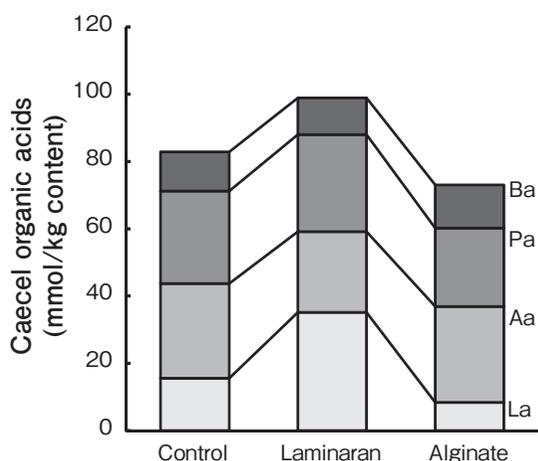


Fig. 4. Cecal organic acid contents of rats fed diets containing no dietary fiber (control), 2% (w/w) laminaran or 2% (w/w) alginate. Ba n-butyric acid, Pa propionic acid, Aa acetic acid, La lactic acid (n=6).

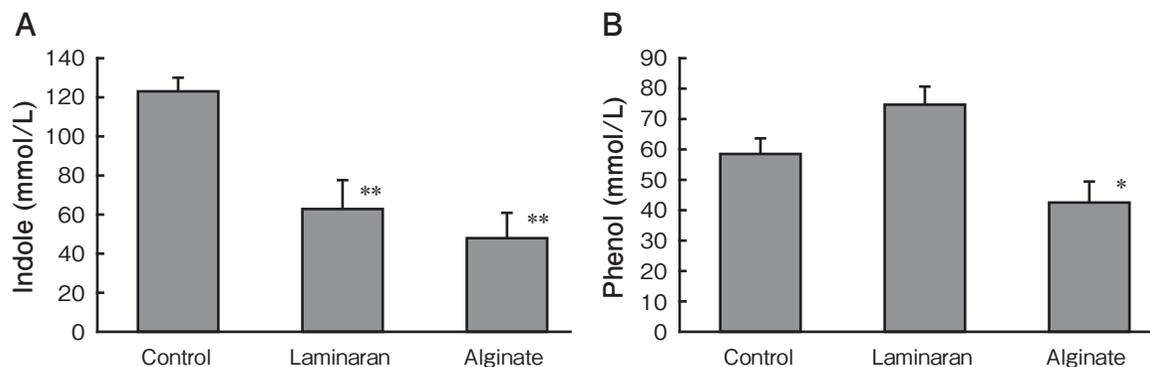


Fig. 5. Cecal putrefactive compound levels in rat fed diets containing no dietary fiber (control), 2% (w/w) laminaran or 2% (w/w) alginate. Putrefactive compounds indole (A), phenol (B). Error bars indicate SEM. *p<0.05; **p<0.01 (n=6).

以上の結果より、褐藻類に含まれている水溶性多糖類のラミナランおよびアルギン酸により大豆たん白質より腸内フローラによって生成される腐敗産物、特にインドールが減少する事が示された。ラミナランは腸内細菌により発酵生成される有機酸が腐敗産物の生産を制御し、一方、アルギン酸の一部は同様に発酵されるが、おおくは排泄を促進することで腐敗産物の濃度を低減すると考えられる⁴⁾。たん白質の種類により腸内腐敗物の量は変動するが、伝統的な食生活の中で、発酵性多糖類を含む食物繊維の摂取が腐敗物産生抑制の重要な役割をしていると推察される。

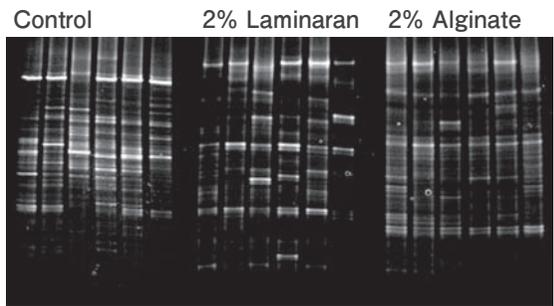


Fig. 6. Representative band patterns from DGGE analysis of the cecal microbiota of rats fed diets containing no dietary fiber (control), 2% (w/w) laminaran or 2% (w/w) alginate ($n=6$).

要 約

成人の大腸内には500種類以上の細菌類が10～100兆個も存在し、その代謝産物が宿主に影響することが知られている。インドールやフェノール、アンモニアなどのいわゆる腐敗物は腫瘍リスクの一部と考えられており、食餌成分によって大きく変動し、例えば、大豆たん白質を与えたラット盲腸内で特にインドールの増加が確認されている。本研究では大豆たん白質由来の腸内腐敗物の産生と、和食において伝統的に食されてきた褐藻類中の、発酵性多糖類による抑制について検討した。大豆たん白質3% (w/v) およびラミナランまたはアルギン酸を1%添加したGAM1/4培地にヒト糞便希釈液を接種し、37℃で48 h嫌気培養した。培養液中の腐敗物であるインドールやアンモニア、フェノールの濃度を比色法で、また発酵の指標として有機酸の組成をHPLC法で測定した。次に、AIN-76のカゼイン20% (w/w) を大豆たん白質に換え、ラミナランまたはアルギン酸を2% (w/w) 加えた餌をラットに15日間自由摂取させ、盲腸内容物の腐敗物と有機酸の組成を調べた。ヒト糞便培養実験では、ラミナランによって乳酸が顕著に増加し、アルギン酸によってプロピオン酸が増加し、腐敗物の産生が抑制された。ラットの盲腸内容物においてはラミナラン食群では乳酸の増加傾向がみられ、pHが低下しており、インドールが有意に減少していた。アルギン酸食群ではpHや有機酸の有意な変化はみられなかったが、インドールの減少とフェノールの減少が認められた。以上の結果より、たん白質の種類により腸内腐敗物の量は変動するが、伝統的な食生活の中で、発酵性多糖類を含む食物繊維の摂取が腐敗物産生抑制の重要な役割をしていると推察される。

文 献

- 1) Mitsuoka T (2000): Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Biosci Microflora*, **19**, 15-25.
- 2) Reddy BB (1995): Nutritional and colon cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **35**, 175-190.
- 3) Kuda T, Yano T, Matsuda N and Nishizawa M (2005): Inhibitory effects of laminaran and low molecular alginate against the putrefactive compounds produced by intestinal microflora in vitro and in rats. *Food Chem*, **91**, 745-749.
- 4) An C, Kuda T, Yazaki T, Takahashi H and Kimura B (2013): FLX pyrosequencing analysis of the effects of the brown-algal fermentable polysaccharides alginate and laminaran on rat cecal microbiotas. *Appl Environ Microbiol*, **79**, 860-866.
- 5) An C, Kuda T, Yazaki T, Takahashi H and Kimura B (2014): Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal. *Appl Microbiol Biotechnol*, **98**, 2779-2787.
- 6) Kuda T, Goto H, Yokoyama M and Fujii T (1998): Fermentable dietary fiber in dried products of brown algae and their effects on cecal microflora and levels of plasma lipid in rats. *Fisheries Sci*, **64**, 582-588.
- 7) An C, Takahashi H, Kimura B and Takashi K (2010): Comparison of PCR-DGGE and PCR-SSCP analysis for bacterial flora of Japanese traditional fermented fish products, *aji-narezushi* and *iwashi-nukazuke*. *J Sci Food Agric*, **90**, 1796-1801.