

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：20104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650491

研究課題名(和文)大腸内発酵によってペクチンは生体に有害なメタノールの供給源となるか？

研究課題名(英文)Pectin can be sources of methanol by fermentation in the large intestine.

研究代表者

西村 直道(Nishimura, Naomichi)

名寄市立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：10341679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：メトキシ化されたペクチンが大腸内に常在する細菌によって発酵される際、メタノールが遊離され生体に供給される可能性を明らかにするため、メトキシ化度の異なるペクチンをラットに与えたときのメタノール遊離量および血中ギ酸濃度の変化を調べた。その結果、ペクチンは大腸内発酵でメタノールを遊離し、生体内へのメタノール供給源となることが判明した。この発酵には、大腸菌が寄与していることもわかった。また、高メトキシペクチンほどメタノール遊離量が多く、血中ギ酸濃度の上昇を引き起こす可能性も示唆された。以上より、ペクチンは大腸内発酵によって生体内にメタノールを供給することがわかった。

研究成果の概要(英文)：To determine whether methanol is released by fermentation of low- and high-methoxy pectin in the large intestine, and then supplied in the body, we examined the change in released methanol into the bloodstream and plasma formate concentration in rats fed different degree of methylation of pectin. Methanol was released from methoxy pectins in the large intestine and methanol concentration in portal and arterial plasma was significantly higher in rats fed pectin. The release could be attributed to degradation of pectin by *Escherichia coli*. Also, the released content of methanol was higher in rats fed high-methoxy pectin than in those fed low-methoxy pectin. Higher plasma formate concentration was observed in rats fed high-methoxy pectin. Taken together, methanol is supplied in the body by fermentation of pectin in the large intestine.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ペクチン メタノール 大腸内発酵 腸内細菌 ギ酸 大腸

## 1. 研究開始当初の背景

植物の構造多糖で水溶性食物繊維であるペクチンは、果物や野菜からの食物繊維摂取に寄与している。また、ペクチンは加工食品素材としても広く利用され、大腸内発酵を促進する成分として国内外で精力的に研究されてきた。ガラクトuron酸を主要構成糖とするペクチンには、一部のカルボキシ基にメタノールがエステル結合している(メトキシ化)。このため、この結合が分解すれば、メタノールが遊離する可能性がある。多量のメタノール摂取は網膜損傷や代謝性アシドーシスなど毒性を示すため、摂取量を低くすることが欠かせない。一部の細菌はこのメチルエステル結合を分解するペクチンエステラーゼを有し、大腸内にも類似酵素を有する細菌が存在する可能性が示されている。したがって、ペクチン摂取により大腸でメタノールが遊離され、生体に供給されることで代謝等に影響を及ぼす可能性が考えられる。類似の仮説も近年提唱されている。また、ヒト糞便による *in vitro* ペクチン発酵でメタノールが生成されることが報告されている。しかしながら、ペクチンが生体内でメタノール供給源となりうることはいまだ証明されていない。ペクチンから遊離するメタノール量は急性毒性を示す量では決していないが、低量のメタノールに長期間曝露されることで、生体内の代謝が攪乱され、疾病発症に関わることも予想される。このため、ペクチンの大腸内発酵がメタノールの生体内供給源となりうることを明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

メタノールの酸化分解によって生ずるギ酸の細胞毒性は強い。多量のメタノール摂取が過剰なギ酸生成を促し、毒性を発揮する。ペクチン中のメトキシ基がすべて遊離したとしても、急性毒性が引き起こされる量ではないが、低量のメタノールに長期間曝露されることで生体の代謝変動が惹起される可能性は否定できない。本研究では、大腸内発酵によるペクチンの有するメトキシ基の分解が、生体内へのメタノール供給源となることを明らかにし、ペクチンのメトキシ化度および摂取量と大腸内メタノール遊離量との関係を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1)ペクチンサンプルの脱糖処理

ペクチンサンプルとして、レモン由来の低メトキシペクチン(Unipectin LMSN325 CITRUS, Unitec Foods)と高メトキシペクチン(Unipectin SS150 CITRUS, Unitec Foods)を用いた。製造過程において、両製剤ともグルコースを添加しているため、以下の脱糖処理を行った。

ペクチン(200g)に78%エタノール(1L)を加え、10分間攪拌した後、吸引ろ過により残渣を得た。この残渣に再度78%エタノール

(1L)を加え、10分間攪拌した後、吸引ろ過により残渣を得た。この操作をもう一度実施した。得られた残渣に95%エタノール(1L)を加え攪拌後、吸引ろ過により残渣を得た。この残渣を風乾した(以下、得られた脱糖低メトキシペクチンをLMP、脱糖高メトキシペクチンをHMPとした)。

### (2)脱糖ペクチンのメトキシ化度決定

各脱糖ペクチンの0.5%溶液を調製し、0.1 mol/L NaOH溶液を等量加え、室温で40分間放置する。その後、5% CuSO<sub>4</sub>, 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を等量加え、タンパク質を除去し、得られた上清をガスクロマトグラフィー法でメタノール量を測定し、算出した。

### (3)メトキシ基を有するペクチンの大腸内発酵によるメタノール遊離の可能性

カゼインをタンパク質源としたコントロール(B)食で3日間予備飼育した後、体重を基準に3群に組分け、C食、C食にLMPもしくはHMPを5%添加した飼料(LMP食およびHMP食)を7日間与えた。試験開始0、3、7日後にラットを密閉チャンバーに5分間入れ、呼気と放屁に排出されるメタノール量をガスクロマトグラフィーで測定した。試験最終日(試験開始7日後)に麻酔下で解剖し、門脈血および動脈血を採取後、ただちに盲腸内容物を得た。採取した血液から血漿を得て、メタノール濃度をガスクロマトグラフィー法で測定した。盲腸内容物の一部を希アルカリ溶液および希酸溶液で処理した後、遊離したメタノール量を測定することにより、盲腸内容物中の(遊離+結合)メタノール濃度および遊離メタノール濃度をそれぞれ測定した。盲腸内の腸内細菌叢パターンを16S rDNAの特異的領域を増幅した後、PCR-DGGE(変性グラジエントゲル電気泳動)法で解析した。特異的に強度の上昇が認められたバンドを採取し、PCRクローンライブラリを実施し、そのDNAシーケンスを解析した。この塩基配列をBLAST解析により、細菌種を同定した。また、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度変動をHPLC法で測定した。

### (4)ヒト葉酸代謝モデルラットへのペクチン投与が血中ギ酸濃度に与える影響

カゼインをタンパク質源とした葉酸充足コントロール(B)食で3日間予備飼育した後、体重を基準に5群に組分け、9日間試験飼育した。それぞれB食、葉酸欠乏コントロール(C)食、C食+メトトレキサート(Mtx)投与、C食+5%HMP+Mtx投与、C食+メタノール投与+メトトレキサート投与の5群(それぞれB群、C群、C-Mtx群、P-Mtx群、M-Mtx群)とした。葉酸欠乏食とMtxの投与は、ラットの葉酸代謝をヒトのそれに模倣するために行った。Mtx投与量は、0.3 mg/kg/日を皮下投与とした。メタノール投与は、1日にペクチンより遊離されると想定される量を飲水投与した。

試験最終日（試験開始7日後）に麻酔下で解剖し、門脈血および動脈血を採取後、ただちに盲腸内容物を得た。採取した血液から血漿を得て、メタノール濃度をガスクロマトグラフィ法で測定した。盲腸内容物の一部を希アルカリ溶液および希酸溶液で処理した後、遊離したメタノール量を測定することにより、盲腸内容物中の（遊離+結合）メタノール濃度および遊離メタノール濃度をそれぞれ測定した。血漿ギ酸濃度および盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度変動を HPLC 法で測定した。血漿葉酸濃度を市販のキットを用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脱糖ペクチンの収率

LMP および HMP の収率は、それぞれ 72.1% および 74.7% だった。

##### (2) 脱糖ペクチンのメトキシ化度

LMP および HMP のメトキシ化度は、それぞれ 23.5 (0.235 mol methanol/mol galacturonic acid) および 54.5 (0.235 mol methanol/mol galacturonic acid) だった。

##### (3) メトキシ基を有するペクチンの大腸内発酵によるメタノール遊離の可能性

摂食量および体重増加量は、メトキシ化度が高いほど C 食群より低下した。特に、HMP 食群の摂食量と体重増加量は、C 食群より有意に低下した。LMP 食群と HMP 食群の（呼吸+放屁）中メタノール排出量は、試験期間中上昇し続け、試験7日後の LMP 食群および HMP 食群でそれぞれ C 食群の 10 倍および 33 倍高かった（図1）。

門脈血漿および動脈血漿中のメタノール濃度もまた C 食群より有意に両ペクチン摂取群で有意に高値を示した（図2）。特に HMP 食群のメタノール濃度が高く、メトキシ化度の高いペクチンのメタノール遊離が亢進する可能性が示唆される。また、高濃度の動脈血メタノールの存在は、肺から呼吸に排出される量が多くなく、全身にメタノールが供給されていることを示している。盲腸内のメタノール濃度もペクチン摂取によって有意に高く、LMP より HMP で遊離するメタノール量が多かった（図3）。この結果より、ペクチンに結合しているメトキシ基が大腸内の細菌によって遊離することがわかった。また、ペクチンのメトキシ化度が高いほど、メタノール遊離が進むことが判明した（図3）。

DGGE のバンドパターン解析から、それぞれの群で異なる腸内細菌叢パターンが示された。また、HMP 食群の腸内細菌叢パターンは C 食群や LMP 食群とも大きく異なった（図4）。以上より、同じペクチンでも、メトキシ化度の違いによって腸内細菌叢パターンも異なることが示された。HMP 食群で顕著に増加が認められたバンドをクローニングし、BLAST 解析した結果、*Escherichia coli* と高い相同性（100%）

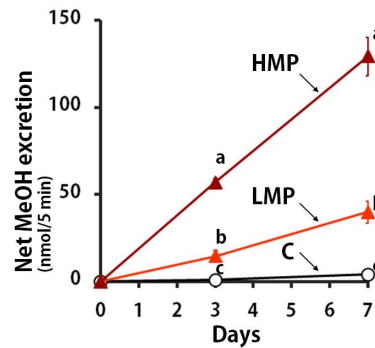


図1 ペクチン摂取ラットにおける（呼吸+放屁）メタノール排出量の変動

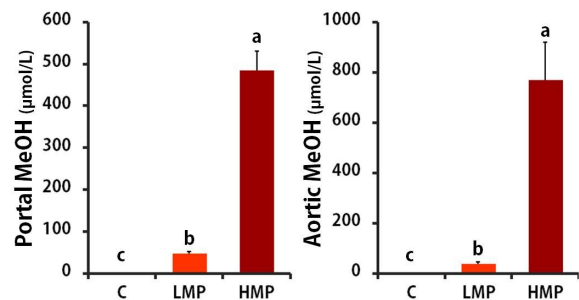


図2 ペクチン摂取ラットにおける門脈および動脈メタノール濃度の変動

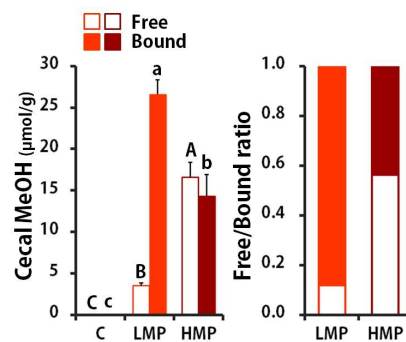


図3 ペクチン摂取ラットの盲腸内遊離メタノール濃度およびペクチン結合メタノール濃度

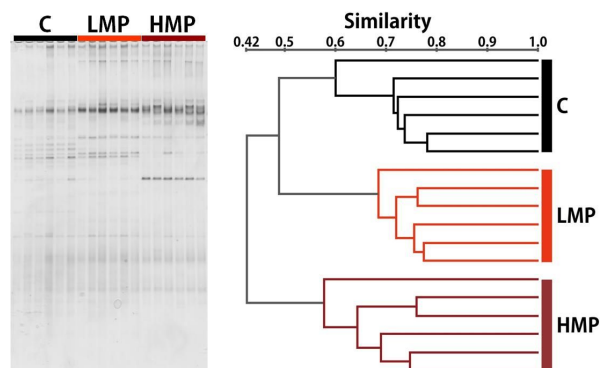


図4 ペクチン摂取ラットの盲腸内細菌 16S rDNA-PCR DGGE 解析と細菌叢クラスター解析 (UPGMA 法)

が認められた。以上の結果より、ペクチンの有するメトキシ基は大腸内の細菌によって切断され、生体内へのメタノール供給源となっていることがわかった。

#### (4) ヒト葉酸代謝モデルラットへのペクチン投与が血中ギ酸濃度に与える影響

試験終了時の血漿葉酸濃度は、B 食群に比べ、葉酸欠乏食を与えた他の群ですべて有意に低かった(図5)。このことから、葉酸代謝速度の速いラットをヒトの葉酸レベルに模倣できた可能性が示唆される。また、メトトレキサートを投与しなくても、葉酸欠乏食のみで十分生体内の葉酸レベルを下げる事が可能であることもわかった。

C-Mtx 群および M-Mtx 群に比べ、P-Mtx 群の摂食量は有意に低く、体重増加量は低下傾向を示した。試験最終日の門脈および動脈血漿中のメタノール濃度は、P-Mtx 群および M-Mtx 群で C-Mtx 群より有意に高かった(図6)。動脈メタノール濃度と試験最終3日間のペクチン摂取量の間には有意な正の相関が認められた( $r=0.897$ ,  $P=0.0062$ )。統計的有意差はなかったが、P-Mtx 群の盲腸内メタノール濃度は、他の群より高くなる傾向が認められた。動脈ギ酸濃度は、P-Mtx 群および

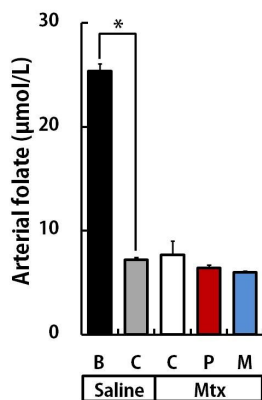


図5 葉酸欠乏食投与およびメトトレキサート投与ラットにおける動脈葉酸濃度変動

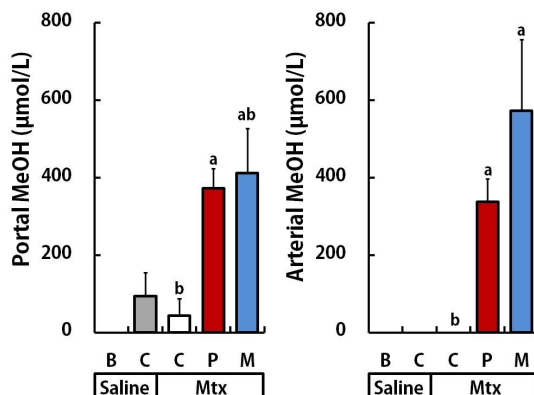


図6 葉酸欠乏ラットにおける門脈および動脈メタノール濃度に及ぼすペクチン投与の影響

M-Mtx 群で C-Mtx 群より高くなる傾向が見られた。しかし、動脈 pH に有意な群間の差はなかった(図7)。以上のことから、大腸でペクチンから遊離したメタノールはギ酸に代謝され、血液中に放出されていることがわかった。ただし、あくまでメタノール急性毒性を示す量ではなく、今後慢性的にこのような低濃度のメタノールに曝露されたときの代謝変動の可能性を調べる必要がある。また、ペクチン摂取量が増加すると、血液中のメタノール濃度が増加することから、今後適切なペクチン摂取量を明らかにしていくための基礎的データを得る必要がある。さらに、HMP からのメタノール遊離に *Escherichia coli* が直接関与している可能性を検証していくことも重要である。

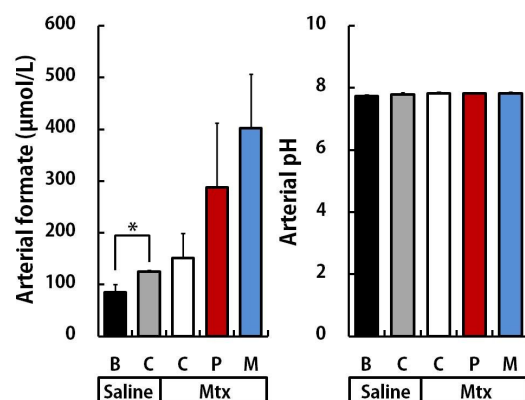


図7 葉酸欠乏ラットにおける動脈ギ酸濃度および pH に及ぼすペクチン投与の影響

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Naomichi NISHIMURA, Hiroki TANABE, Misato Adachi, Tatsuro YAMAMOTO, Michihiro FUKUSHIMA, Colonic hydrogen generated from fructan diffuses into the abdominal cavity and reduces adipose mRNA abundance of cytokines in rats. *J Nutr*, **143**, 1943-1949, 2013. 査読有

[学会発表](計4件)

西村直道, ペクチンの大腸内発酵によって生体内にメタノールが供給される. 第66回日本栄養・食糧学会大会, 2012年5月19日, 仙台

小森絵理香, 高アミロースデンプン摂取ラットの腸 H<sub>2</sub> 生成に及ぼす高 H<sub>2</sub> 生成細菌叢. 第66回日本栄養・食糧学会大会, 2012年5月19日, 仙台

西村直道, フラクタン摂取による大腸生成 H<sub>2</sub> の増加は食餌誘発性肥満における慢性炎症を軽減する?. 第67回日本栄養・食糧学会大会, 2013年5月26日, 名古屋

Naomichi NISHIMURA, Hiroki TANABE, Yumi SASAKI, Yui MAKITA, Misako OHATA, Tatsuro YAMAMOTO, Hydrogen generated by fermentation of dietary fiber and resistant starch relieves oxidative stress in rats. 20th International Congress of Nutrition, Sep. 16, 2013, Granada, Spain

〔その他〕

<http://www11.ocn.ne.jp/~nutrbio/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 直道 (NISHIMURA NAOMICHI)  
名寄市立大学・保健福祉学部・教授  
研究者番号：10341679