

老化米の投与がラットの成長と鉄状態に及ぼす影響

吉田 宗弘[†], 泉井 望希, 神田 珠希, 細見 亮太, 福永 健治

(関西大学化学生命工学部栄養化学・食品化学研究室*)

(受付 2020年8月30日, 受理 2020年10月7日)

Effect of retrograded rice administration on growth and iron status in rats

Munehiro YOSHIDA, Nozomi IZUI, Tamaki KANDA, Ryota HOSOMI, Kenji FUKUNAGA

Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering,
Kansai University

Summary

The digestibility of retrograded starch was evaluated by an *in vitro* digestion test and a nutritional test using rats. Uncooked polished rice (*Koshihikari* from Niigata Prefecture in 2019), commercially available gelatinized rice (Onisi Foods Co., Ltd.), and retrograded rice were used as foods containing raw starch, gelatinized starch, and retrograded starch. The retrograded rice was prepared by spreading cooked polished rice on a stainless-steel tray, leaving it at 4°C for 1 day, and then freeze-drying. The *in vitro* digestibility of each rice sample was 86% in gelatinized rice, 72% in retrograded rice and 37% in uncooked polished rice. Eighteen male 4-week-old Wistar rats were divided into three groups, and each of them was fed a diet containing 12% of protein and consisting mainly of uncooked polished rice, gelatinized rice or retrograded rice for 4 weeks. The weight gain, feed efficiency, serum total protein, albumin and total lipid concentration, and liver lipid concentration in the retrograded rice administration group were significantly lower than those in the other two groups. These results indicate that retrograded starch is not well digested *in vivo* as compared with gelatinized starch. In the retrograded rice-administered group, hemoglobin concentration, serum transferrin saturation, and liver iron concentration were significantly high, and it was estimated that low protein and energy status caused by retrograded rice administration changed iron metabolism. On the other hand, the uncooked polished rice administration group showed the same growth as the gelatinized rice administration group, which was different from the result of the *in vitro* digestion test. This result is coincident with previous reports but the mechanism by which rats can utilize raw starch is unknown.

一般にデンプンは、水を加えて加熱すると糊化が生じ、消化性が高まる。このため、穀物やイモ類のようにデンプン含量が高い食品は、ヤマノイモのような一部の例外はあるものの、加熱して食べられることが圧倒的である。この加熱調理によって糊化したデンプンを放置すると老化が起こり、消化性は低下する。

天然のデンプンの中には、ヒトの消化酵素の影響を受けにくいものも多く、難消化性デンプン（レジスタントスターチ：RS）と呼ばれている。RSは食物繊維の一種とみなすことができ、食物繊維と同等の栄養的意義があると考えられている^{1,2)}。近年では老化したデンプンも難消化性であることから、type 3のRS（RS3）と位置づけられており、プラスの評価を与える研究者も現れている³⁾。このた

め、一般消費者向けのメディアにおいては、加熱調理して含まれるデンプンを糊化させた食品を、あえて冷蔵庫に保存し、老化デンプンを増やすことを推奨するようなものも登場している。確かに、冷やご飯などのように、加熱後、冷所に放置した高デンプン食品では、含まれているデンプンの試験管内消化率が糊化直後よりも低下していることが確認できる⁴⁾。しかし、このような老化したデンプンを含む食品を摂食した場合、試験管内で観察された低消化率が実際にどの程度の影響を及ぼしているのかは定かでない。

老化デンプンを難消化性デンプン的一种としてみなす解説の多くは、その効能として糖質や脂質の吸収性の低下を説いており²⁾、一般消費者が肥満解消のためのエネルギー制限などに応用する可能性は大きい。しかし、たとえば

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35（〒564-8680）

†連絡先（Corresponding author）, Tel: 06-6368-0970, E-mail: hanmyou4@kansai-u.ac.jp

20歳代女性においては20%近くがBMI値18.5未満の痩せの状態にあることから⁵⁾、老化デンプンの摂取が不要なエネルギー制限につながるリスクも考えられる。

食物繊維類のミネラル吸収に及ぼす影響について、かつては抑制的に作用するという捉え方が多かったが、近年ではむしろ促進的に作用するという報告が多数提出されている^{6,7)}。老化デンプンのミネラル吸収に及ぼす影響についてラットや豚を用いた研究では、カルシウム、マグネシウム、リンの吸収に対して悪影響は与えていないことが示されている^{8,9)}。日本人のミネラルの摂取状況を見た場合、カルシウムとともに、鉄の摂取不足は解消されておらず、とくに痩せの割合が高い若年女性での不足が目立っている⁵⁾。したがって、老化デンプンの鉄の状態に及ぼす影響についても検討する必要がある。

成長期のラットに消化性の低いデンプンを含む飼料を投与すると、エネルギー不足を補うために飼料中のタンパク質が成長ではなくエネルギー源として利用される。この時、飼料のタンパク質含量が低いと、エネルギーに用いられたタンパク質量の分だけ成長は遅くなり、消化性の程度が発育量に反映されることになる。本研究では、実際に家庭で起こりうる程度のデンプンの老化が全般的な栄養状態にどの程度の影響を及ぼすのかを検討する目的で、一晚冷蔵庫に放置して表面が乾燥した冷やご飯を老化米と位置づけ、これを糊化米、および未調理の精白米とともに低タンパク質食の糖質源として用いた実験飼料を調製した。そして、これらの飼料を成長期ラットに投与し、老化米の投与がラットの成長や鉄の状態などにどのような影響を及ぼすかを検討した。

実験方法

1. 老化米の調製

精白された2019年新潟県産こしひかりを電気釜で炊飯し、暖かい間にステンレス製トレー（内径225×330×80mm）内で均一（高さ約30mm）に広げ、家庭用冷蔵庫において4℃で24時間放置した。放置によって表面が乾燥した炊飯米を凍結乾燥後、ミルで細粉化し、老化米試料とした。対照として、生デンプンの状態である未調理の精白米（2019年新潟県産こしひかり）と糊化された状態で市販されている糊化米（尾西食品株式会社、東京）を同様に凍結乾燥後、細粉化し、それぞれ未調理米試料、糊化米試料とした。凍結乾燥したことによりいずれのコメ試料も水分含量は5%となった。なお、糊化米を実験室で調製しなかったのは、炊飯の凍結保存中に老化が生じる可能性があるためと判断したためである。

2. 試験管内消化試験

各コメ試料の試験管内での消化試験は糊化操作を行わない条件でEnglystらの方法¹⁰⁾に基づき行った。すなわち、各コメ試料を5%含む懸濁液2mLに、*Bacillus subtilis*由

来の α -アミラーゼ溶液（12,000 unit/mL、富士フィルム和光純薬、大阪）0.5 mL、*Rhizopus sp.*由来のアミログルコシダーゼ溶液（800 unit/mL、東京化成工業、東京）0.1 mL、0.1Mマレイナトリウム酸緩衝液（pH 6.0）3.4 mLを加え、37℃で振盪させながら含有されるデンプンを消化させた。消化開始から経時的に120分後まで0.2 mLずつ反応液を採取し、0.4 mLエタノールを加えて反応を停止させた。さらに4 mLの蒸留水を添加後、遠心分離（1,500×g、10分）を行い、得られた上清中のグルコース濃度をD-glucose assay kit（Megazyme, Bray）を用いて定量した。消化されたデンプン量は得られたグルコース量に換算係数（0.9）を乗じて算出し、もとのコメ試料中のデンプン量（日本食品標準成分表（七訂）における精白米の炭水化物含量77.6%、水分含量14.9%、および調製した各コメ試料の水分含量5%にもとづき86.6%と算定）から消化率を求めた。

3. 動物実験

4週齢のWistar系雄ラット18匹（平均体重85g）を6匹ずつ3群に分け、それぞれに精白米、糊化米、老化米試料を主体とした飼料を自由摂取法にて4週間与えた。各コメ試料を含む実験飼料の組成はTable 1に示した。飼料のタンパク質含有量は12%である。飼育期間終了後、血液と肝臓を採取した。以上の動物実験は、関西大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

採取した血液についてヘモグロビン濃度の測定と血清生化学検査を行った。測定は日本医学株式会社（貝塚）に委託した。肝臓についてはBligh-Dyer法¹¹⁾にて総脂質濃度、原子吸光度法にて鉄と亜鉛濃度を測定した。

4. 結果の統計処理

実験群間の比較においては分散分析を行い、有意であった場合にはTukeyによる多重比較を行った。また、各群の成長の比較においては繰り返しのある二元配置分散分析を行った。いずれにおいても有意水準は $p < 0.05$ とした。

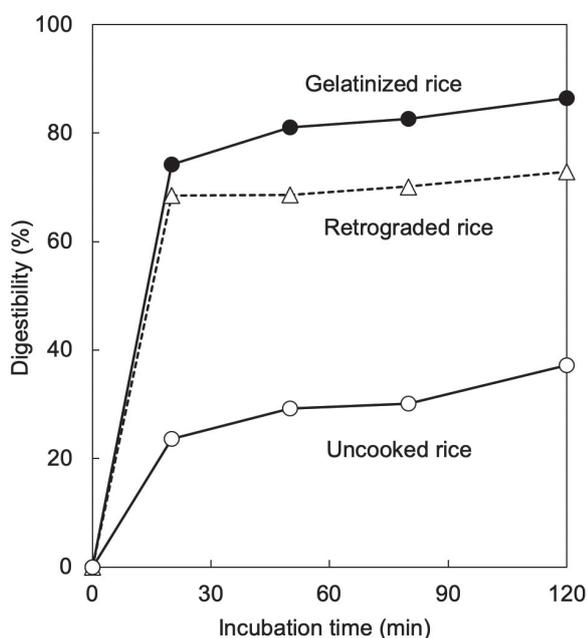
結果

Fig. 1に各コメ試料を試験管内で消化したさいの消化率を示した。糊化米の消化率は、反応開始20分後において70%以上であり、120分後には88.5%に達した。これに対して老化米の消化率は、糊化米をやや下回り、120分後において72.9%であった。一方、生デンプンの状態である未調理の精白米の消化率はきわめて低く、120分後でも37.1%に過ぎなかった。

3種のコメ試料からなる飼料を投与したラット各群の成長曲線をFig. 2に、各種の測定結果をTable 2にまとめた。老化米を与えた群の発育は、糊化米を与えた群と比較してやや抑制されており、飼育期間終了時点では体重増加量が平均値で約30g少なかった。これに対して、未調理の精

Table 1 Composition of experimental diet

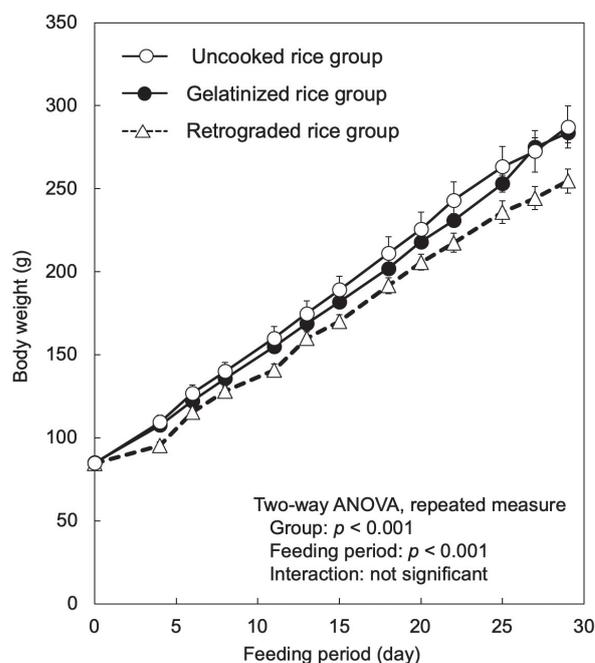
	%
Rice powder	75.0
Casein	7.0
Soybean oil	5.0
AIN93G mineral mixture	3.5
AIN93 vitamin mixture	1.0
Choline bitartrate	0.2
Cellulose powder	1.0
Sucrose	7.0
L-Lysine	0.2
L-Cystine	0.1

**Fig. 1** *In vitro* digestibility of uncooked, gelatinized or retrograded polished rice powder.

白米を与えた群の発育は糊化米を与えた群とほぼ同等であった。体重増加量と同様に、飼料効率、血清総タンパク質、血清アルブミン、血清総脂質濃度、肝臓総脂質濃度も老化米を与えた群が他の2群に比較して有意に低い値であった。逆に、肝機能の指標である血清 aspartate aminotransferase (AST) と alanine aminotransferase (ALT)、鉄状態の指標であるヘモグロビン、血清トランスフェリン飽和率、肝臓鉄濃度は老化米を与えた群が有意に高い値を示した。また、血清カルシウム濃度は老化米投与群がもっとも低い値であり、未調理精白米投与群との間には有意差が認められた。

考 察

老化米を投与した群では、未調理の精白米または糊化米を投与した群に比較して、成長が劣り、栄養状態を反映す

**Fig. 2** Growth curve of rats fed diets composed mainly of rice. Position of the marker and length of the bar attached to the marker represent mean and the range of standard error, respectively.

る血清生化学指標のいくつかが低下していた。これらのことは、ラット体内での老化米の消化吸収性が、未調理の精白米、および糊化米よりも低く、老化米投与群のラットが不足したエネルギーをタンパク質で補ったことを示している。すなわち、老化したコメデンプンはラット体内においても糊化デンプンよりも消化性が低いことが確認できたといえる。

菅原は、老化米、または糊化米を含むタンパク質濃度20%の飼料を成長期ラットに投与し、老化米投与群の盲腸においてpHの低下、短鎖脂肪酸生成量の増加を認めているが、成長に差はなかったとしている¹²⁾。菅原の実験において成長に差がなかったのは、飼料中のタンパク質濃度が十分に高かったため、摂取したタンパク質の一部がエネルギーとして消費されても成長にまでは影響が及ばなかったと解釈できる。なお、桜井らは、穀物やイモ類由来の生デンプンまたは糊化デンプンを含むタンパク質濃度15%の飼料を用いて、生のジャガイモデンプンを与えた場合にラットの生育が劣ることが確認している¹³⁾。このことから、デンプンなどの糖質の利用性を成長期ラットによる栄養試験で確認する場合、飼料中のタンパク質濃度を少なくとも15%以下にする必要があるといえるだろう。

生デンプンを含む未調理の精白米は消化試験においてきわめて低い消化率であったにもかかわらず、実際にラットに投与した場合は糊化米と同等の栄養効果を示した。すなわち、ラットの消化管において、老化デンプンは消化されていなかったが、生デンプンは消化されていたことになる。ラットがドブネズミ *Rattus norvegicus* を品種改良した実験動物であり、ドブネズミがコメをはじめとする穀物を摂

Table 2 Effects of retrograded rice administration on growth, serum protein, serum and liver lipids, liver function and iron status in rats

	Polished rice powder supplied		
	Uncooked rice	Gelatinized rice	Retrograded rice
Body weight gain (g)	203 ± 10 ^b	199 ± 5 ^b	170 ± 7 ^a
Feed efficiency	0.303 ± 0.015 ^b	0.266 ± 0.006 ^b	0.208 ± 0.008 ^a
Serum biochemistry test			
Total protein (mg/dL)	5.00 ± 0.06 ^b	4.92 ± 0.07 ^b	4.67 ± 0.06 ^a
Albumin (mg/dL)	3.45 ± 0.04 ^b	3.40 ± 0.06 ^b	3.18 ± 0.05 ^a
Triglyceride (mg/dL)	98 ± 15 ^a	106 ± 21 ^a	53 ± 8 ^a
Total cholesterol (mg/dL)	56 ± 3 ^a	52 ± 1 ^a	50 ± 2 ^a
Total lipid (mg/dL)	269 ± 24 ^b	272 ± 20 ^b	193 ± 12 ^a
AST (U/L)	95 ± 4 ^a	93 ± 2 ^a	106 ± 2 ^b
ALT (U/L)	59 ± 3 ^a	53 ± 4 ^a	74 ± 3 ^b
Calcium (mg/dL)	10.8 ± 0.1 ^b	10.6 ± 0.1 ^{ab}	10.4 ± 0.1 ^a
Iron (µg/dL)	214 ± 13 ^a	210 ± 15 ^a	226 ± 9 ^a
Transferrin saturation (%)	41.7 ± 3.0 ^a	41.9 ± 3.4 ^a	55.1 ± 2.8 ^b
Hemoglobin (g/dL)	12.3 ± 0.1 ^a	12.3 ± 0.2 ^a	13.0 ± 0.1 ^b
Liver			
Total lipid (mg/g)	36.0 ± 5.6 ^b	26.4 ± 3.7 ^b	6.6 ± 1.2 ^a
Iron (µg/g)	51 ± 7 ^a	53 ± 7 ^a	77 ± 5 ^b
Zinc (µg/g)	21 ± 1 ^a	22 ± 1 ^a	21 ± 1 ^a

Values are means ± SEM (n=6). Means in the same row not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

食することを考えれば、生デンプンが消化できるという結果は当然といえるだろう。今回示したような、コメの生デンプンがラットにおいて糊化デンプンと同様に消化されていることは、先に紹介した桜井らの実験によって約70年前に確認されている¹³⁾。生デンプンが消化されるプロセスとして、ラットでは唾液アミラーゼと胃酸の相乗作用によるデンプン粒の物理的な破壊¹⁴⁾、サルでは腸内細菌の関与¹⁵⁾が指摘されている。さらに、消化試験が閉鎖系であって消化管内とは同等ではないこと、あるいは生デンプンは消化速度が遅いだけで、最終的には糊化デンプンと同等に消化される可能性なども考慮すべきであろう。これらについては今後の検討が必要である。

老化米を与えた群では、ヘモグロビン濃度、トランスフェリン飽和率、肝臓鉄濃度が他群よりも有意に高値であった。坂田らは、無タンパク質食を14日間与えた8週齢ラットにおいて、ヘモグロビン、血清鉄、トランスフェリン飽和率、および血清ヘプシジン濃度が有意に上昇し、病理検査において肝臓に軽度の鉄沈着が生じることを認め、タンパク質やエネルギー栄養障害においてはヘプシジン合成が亢進するため、貯蔵鉄が増加するとしている¹⁶⁾。また、肥満ラットにおいて飼料投与量を50%制限すると、臓器に鉄沈着が生じることも報告されている¹⁷⁾。本実験で用いた老化米飼料は12%のタンパク質を含んだものであったが、老化米投与群では糊化米投与群に比べて、血清のアル

ブミン値や総脂質濃度、および肝臓脂質濃度が低下しており、タンパク質およびエネルギー栄養状態が低下していることは明らかであった。本実験の老化米投与群で認められた鉄状態の指標の上昇にヘプシジンが関わっているかは不明であるが、栄養状態の低下に伴って鉄の代謝に変化が生じ、体内鉄の分布に変化が生じることは明らかといえる。

以上のように低タンパク質条件下での老化米投与は、タンパク質およびエネルギー栄養状態の低下に起因する鉄代謝の変動を招くため、老化米自身が鉄の吸収にどのような影響を及ぼしているかの検討はできなかった。血清カルシウム濃度が老化米投与群においてわずかに低下しており、老化米がミネラル吸収を阻害している可能性も考えられるが、体内でのカルシウムの動態にタンパク質およびエネルギー栄養状態の低下が関わる可能性もあるので、今回の結果のみで断定はできない。今回は老化米の消化性を検討することを主な目的として実験条件を設定したが、今後、老化米が鉄を含むミネラル吸収に与える影響を検討する場合には、飼料中タンパク質濃度を高くして、主要栄養素の栄養状態に変化が生じない条件で検討することが必要であろう。

老化米投与群ではASTとALTが上昇しており、軽度の肝機能低下が生じていた。鉄沈着が組織に損傷を与えることが知られているが¹⁸⁾、老化米投与群の肝臓鉄濃度の増加はわずかであり、この程度で損傷が生じるとは考えにく

い。老化米投与群における肝機能低下も、タンパク質およびエネルギー栄養状態の低下によって、鉄代謝以外の様々な代謝異常が生じたために起こったと思われるが、詳細は不明である。

今回の結果は老化デンプンの体内での利用性が糊化デンプンよりも低いことを示していた。利用性低下は軽微ではあるが、主要栄養素が不足する条件では発育抑制や代謝異常につながり無視できない。調理した食品を適切に保蔵してデンプンの老化を防止することはやはり重要と思われる。

参考文献

- 1) 早川享志, 柘植治人 (1999) デンプンの摂取と健康 — 難消化性デンプンの生理機能, 日本食物繊維研究会誌 3: 55-64.
- 2) 海老原 清 (2014) レジスタントスターチの栄養・生理機能, 日本調理科学会誌 47: 49-52.
- 3) Morita T, Hayashi J, Motoi H, Yagishita T, Takeya K, Sugiyama K, Kiriyama S (2005) In vitro and in vivo digestibility of recrystallized amylose and its application for low glycemic foods, J Food Sci 70: S179-S185.
- 4) 松永暁子, 貝沼圭二 (1981) 澱粉質食品の老化に関する研究 (第1報) 米飯の老化について, 家政学雑誌 32: 653-659.
- 5) 厚生労働省 (2020) 平成30年国民健康・栄養調査報告, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/eiyuu/h30-houkoku_00001.html (2020年8月29日アクセス)
- 6) Morohashi T, Sano T, Ohta A, Yamada S (1998) True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats, J Nutr 128: 1815-1818.
- 7) Moraris MB, Feste A, Miller RG, Lifschitz CH (1996) Effect of resistant and digestible starch on intestinal absorption of calcium, iron, and zinc in infant pigs, Pediatr Res 39: 872-876.
- 8) Heijnen ML, van den Berg GJ, Beynen AC (1996) Dietary raw versus retrograded resistant starch enhances apparent but not true magnesium absorption in rats, J Nutr 126: 2253-2259.
- 9) Heijnen ML, Beynen A (1998) Effect of consumption of uncooked (RS2) and retrograded (RS3) resistant starch on apparent absorption of magnesium, calcium, and phosphorus in pigs, Z Ernährungswiss 37: 13-17.
- 10) Englyst, HN, Kingman SM, Cummings JH (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions, Eur J Clin Nutr 46: S33-S50.
- 11) Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, Can J Biochem Physiol 37: 911-917.
- 12) 菅原正義 (2008) 米飯の老化と難消化性デンプン生成, 長岡工業高等専門学校研究紀要 44: 55-62.
- 13) 桜井芳人, 増原泰三, 渡辺至子, 早川清一 (1951) 澱粉の栄養化学的研究 (1) — 諸種澱粉の差異に就て (1), 食糧研究所研究報告 5: 41-51.
- 14) 多田 洋, 河合文雄 (1977) ジャガイモ生でんぷんのラット消化管内における消化過程, 栄養と食糧 30: 15-21.
- 15) 前田 巖, 桐淵滋雄, 永井康豊, 本間浩之, 中村道徳 (1976) サルによるジャガイモ澱粉粒の消化, 澱粉科学 23: 35-41.
- 16) 坂田文子, 佐々木勝則, 内田貴之, 知久一雄, 高後裕 (2014) タンパク質・エネルギー栄養障害ラットのヘプシジン誘導と鉄代謝に関する研究, 栄食誌 67: 245-253.
- 17) 木村美恵子, 石川円香, 武田厚子, 今西雅代, 武田隆司, 武田隆久 (2004) 50%制限食によるラット肝臓への鉄沈着 — 肥満ラット (Minko rat) に関する研究 (19) —, Biomed Res Trace Elem 15: 105-107.
- 18) 高後 裕, 大竹孝明 (2015) 鉄代謝の生体に及ぼす影響, 外科と代謝・栄養 49: 59-65.