

## カキ肉エキスの給餌によるマウスの糞中ムチン濃度 および回腸 *Mucin2* 発現量の増加効果

石田 達也<sup>1)</sup>, 松井 博之<sup>1)</sup>, 松田 芳和<sup>1)</sup>, 田中 元稀<sup>2)</sup>, 中西 晏里沙<sup>2)</sup>,  
細見 亮太<sup>†, 2)</sup>, 吉田 宗弘<sup>2)</sup>, 福永 健治<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>日本クリニック株式会社 中央研究所\*, (<sup>2)</sup>関西大学 化学生命工学部 食品栄養化学研究室\*\*)

(受付 2023年8月29日, 受理 2023年9月20日)

### Effects of Dietary Oyster-Extract Increases Fecal Mucin Content and Ileum *Mucin 2* Expression Level in Mice

Tatsuya ISHIDA<sup>1)</sup>, Hiroyuki MATSUI<sup>1)</sup>, Yoshikazu MATSUDA<sup>1)</sup>, Genki TANAKA<sup>2)</sup>, Arisa NAKANISHI<sup>2)</sup>,  
Ryota HOSOMI<sup>1)</sup>, Munehiro YOSHIDA<sup>1)</sup>, and Kenji FUKUNAGA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.

<sup>2)</sup>Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University

#### Summary

Oyster-extract (OE) intake can afford numerous health benefits, such as antioxidant, antimicrobial, antitumor, anti-platelet aggregation, and antihyperglycemic effects. This study examined the effect of OE intake on the intestinal barrier function in mice. C57BL/6J mice (4-week-old male) were fed either the AIN93G diet (control group) or the AIN93G diet containing 5.0% (w/w) OE (OE group). After 28 days of the experimental diet feeding, feces, distal ileum, and distal colon were collected. Fecal mucin contents were quantified using a fluorometric assay kit that discriminates O-linked glycoproteins from N-linked glycoproteins. The gene expression levels of *Mucin* (*Muc*) 1 and 2 in the distal ileum and colon were measured by real-time PCR. Fecal mucin contents were significantly increased in the OE group compared to the control group ( $p < 0.01$ ). The *Muc2* expression level in the distal ileum was significantly increased in the OE group compared to the control group ( $p < 0.01$ ). These results indicate that OE intake increased the ileum *Muc2* expression level and fecal mucin content in mice. OE intake may enhance intestinal barrier function by increasing mucin secretion in the distal ileum.

我々は、カキ (*Crassostrea gigas*) の栄養・機能性成分を抽出・濃縮したカキ肉エキスの栄養機能および生体調節機能について研究を行っており、栄養機能については、亜鉛の生体利用性<sup>1-3)</sup>、生体調節機能については、肝臓保護効果<sup>4)</sup>、大腸前癌病変発症予防効果<sup>5)</sup>および腎障害予防効果<sup>6)</sup>などを報告している。近年、我々はカキ肉エキスの摂取による腸内環境改善効果に関する研究を進めている。これまでにカキ肉エキスの摂取は、一般に善玉菌と認識されている *Lactobacillus* 属の腸内の構成比率を増加させる効果を、マウスおよびラット試験で観察している<sup>7, 8)</sup>。また、デキストラン硫酸ナトリウムによって惹起した実験的大腸炎モデルマウスにおいて、腸内細菌叢および菌代謝物である短鎖脂肪酸の改善を介した大腸炎症状の緩和効果も報告

している<sup>9, 10)</sup>。

腸は、病原性細菌やその毒素にさらされているため、これらの因子から身体を守るために、強固な免疫系を備えている<sup>11)</sup>。腸管はムチンを主成分とする粘膜層で覆われ、ムチンは、細菌の侵入や毒素を防ぐ腸バリア機能を担う重要な成分の一つである<sup>12, 13)</sup>。これまでに食物繊維やいくつかのポリフェノール成分は、腸内ムチンの濃度を上昇させ、腸バリア機能を改善することが報告<sup>14, 15)</sup>されているが、カキ肉エキスの給餌による腸バリア機能への影響は検討されていない。そこで本研究では、カキ肉エキスの給餌によるマウス腸内のムチン産生の影響を明らかにするため、糞中ムチン濃度およびムチン遺伝子発現量に及ぼす影響を評価した。

\*所在地：京都市北区大將軍西町1 (〒603-8331)

\*\*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

†連絡先 (Corresponding Author), Tel: 06-6368-1765, E-mail: hryotan@kansai-u.ac.jp

## 実験方法

### 1. 餌料調製

カキ肉エキスは、日本クリニック株式会社（京都）より供与された。カキ肉エキスの一般成分組成は、Table 1 に示した。対照餌料（Control 餌料）は、AIN-93G 組成<sup>16)</sup>の NaCl 量を改変した餌料とした。カキ肉エキス餌料は、Control 餌料に 5%（w/w）カキ肉エキスを添加し、糖質、タンパク質、脂肪および NaCl 量が Control 餌料と同等になるように調製した。Control およびカキ肉エキス餌料の組成を、Table 2 に示した。

### 2. 動物実験

本動物実験は、日本クリニック株式会社内倫理委員会の承認を受けて実施した（承認番号：49002）。実験動物には、

4 週齢雄性 C57BL/6J マウス（日本エスエルシー株式会社、静岡）を用いた。マウスは室温 22℃ ± 1℃、明暗 12 時間サイクル（6:00 ~ 18:00）の条件下で飼育した。実験餌料および水は自由摂取とした。Control 餌料給餌による予備飼育を 1 週間行った後、20 匹のマウスを 10 匹ずつ平均体重が同等になるように、対照（Control 群）およびカキ肉エキス群（OE 群）に分けた。飼育開始 28 日後、イソフルラン（共立製薬株式会社、東京）による深麻酔下で下大静脈より採血することでマウスを安楽死させた。その後、脾臓、回腸および大腸を採取した。脾臓は重量の測定を行った。回腸および大腸末端は RNAlater<sup>®</sup>（Merck KGaA, Darmstadt, Germany）に浸漬して -80℃ で保管した。また、解剖前日の 1 日分の糞を採取し、重量の測定を行い、-80℃ で凍結・保管した。

### 3. 糞中ムチン濃度

糞は凍結乾燥後、ミルにて粉末化した。Fecal Mucin Assay Kit（コスモバイオ株式会社、東京）を用いた糞のムチン濃度の測定は、コスモバイオ株式会社に委託した。

### 4. 遺伝子発現量の評価

RNAlater<sup>®</sup> に浸漬貯蔵していた回腸および大腸末端から TRIzol<sup>®</sup> RNA Isolation Reagents（サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社、神奈川）により Total RNA を調製した。調製した Total RNA は、GoScript<sup>™</sup> Reverse Transcription System（プロメガ株式会社、東京）を用いた逆転写反応により、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として Thermal Cycler Dice<sup>®</sup>

**Table 1** Nutritional composition of oyster-extract

	OE
	g/100g
Crude protein	28.1
Crude fat	2.0
Ash	15.4
NaCl	8.2
Water	3.9
Carbohydrate	50.5
Glycogen	34.6

OE, oyster-extract.

**Table 2** The ingredient composition of experimental diets

	Experimental diets	
	Control	OE
	g/kg	
Casein	200	182.3
Dextrinized corn starch	132	132
Corn starch	397.486	366.486
Sucrose	98.47	100
Cellulose	50	50
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
AIN-93G mineral mixture	35	
Sodium chloride-free AIN-93G mineral mixture		35
Sodium chloride	1.53	
AIN-93 vitamin mixture	10	10
Soybean oil	70	68.7
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014
Oyster-extract		50

Diets were prepared according to the AIN-93G formula.

Real Time System Single 装置 (タカラバイオ株式会社, 滋賀) および GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (プロメガ株式会社, 東京) を用いたリアルタイム PCR 法により遺伝子発現量の定量を行った。遺伝子に対応するプライマーは, 次に示す配列のオリゴ DNA を使用した。 *Mucin 1 (Muc1)*; Forward: GGTGACCACTTCTGCCAACT, Reverse: TCCTTCTGAGAGCCACCACT, *Mucin 2 (Muc2)*; Forward: GCTTTGAGACCTGCAGAACC, Reverse: CGATTTTGGACGTGTTGGTG, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*); Forward: AACGACCCCTTCATTGACCTC, Reverse: ACTGTGCCGTTGAATTTGCC。なお, プライマーの配列は, ウェブツールの Primer3plus (<http://primer3plus.com/>) を用いて作成した。それぞれの遺伝子発現量は, サイクル比較法を用いて, *Gapdh* の遺伝子発現量に対する相対値として表した。

## 5. 人工消化試験

試料は, カキ肉エキスおよび三大栄養素 (炭水化物, 脂質, たんぱく質) がカキ肉エキスと等量になるようにコーンスターチ, 大豆油, カゼインを用いて調製した模倣カキ肉エキスの二つを用いた。人工消化試験は Lucas-González らの方法を一部改変して行った<sup>17)</sup>。すなわち, 試料を 50 mL 容チューブに 2.0 g 秤量し, 人工唾液無機塩類溶液<sup>18)</sup> 2 mL を加え, アミラーゼ粉末を 75 U/mL になるように加えて反応を開始した (口腔内消化)。37°C, 100 rpm で振盪し, 2 分間消化を行った。その後, 塩酸を加えて pH 2.0 に調整後, 人工胃液無機塩類溶液<sup>18)</sup> 4 mL を加え, 豚由来ペプシンを 2000 U/mL を加えて反応を開始した (胃消化)。37°C, 100 rpm で振盪し, 60 分間消化を行った。その後で重炭酸ナトリウム溶液で pH 7.4 に調整後, 人工腸液無機塩類溶液<sup>18)</sup> 8 mL, 胆汁粉末 64 mg を加え, 豚由来パンクレアチン 24 mg を加えて反応を開始した (小腸消化)。37°C, 100 rpm で振盪し, 120 分間消化を行った。胃消化では pH 2.0, 小腸消化では pH 7.4 になるように適時調整した。小腸消化後, 消化反応を停止する

ため, 沸騰温浴中に 30 分間静置した。消化液を透析チューブ (分画分子量: 約 12,000 ~ 14,000) に移し, 流水透析を 2 日間行った。透析チューブ内の溶液を回収し, 凍結乾燥した残渣を難消化性残渣とした。難消化性残渣重量を測定し, 試料重量で除して, 難消化性残渣生成率を求めた。難消化性残渣の水分は 105°C 常圧乾燥法, 灰分は 550°C 直接灰化法, たんぱく質はマイクロケルダール法, 脂質はクロロホルムメタノール混液法でそれぞれ測定し, 炭水化物は差し引き法で求めた。

## 6. 統計処理

得られた測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。群間の差は, Student's *t*-test で検定を行った。有意水準は  $p < 0.05$  とし,  $0.05 \leq p < 0.10$  の場合は傾向があるとした。統計解析は GraphPad Prism ver. 7.0d (GraphPad Software, California, USA) を用いて行った。

## 結果および考察

Table 3 に成長パラメーターおよび解剖時臓器重量を示した。成長パラメーター (初体重, 終体重, 体重増加および餌料摂取量) および解剖時の脾臓重量は, 両群間で有意な変化は見られなかった。

カキ肉エキスの給餌が, マウスの腸バリア機能に及ぼす影響を調べるため, 糞中ムチン濃度を分析した。Fig. 1 に, 糞の湿重量およびムチン濃度を示した。OE 群の糞湿重量は, Control 群と比較して, 増加する傾向が見られた ( $p = 0.05$ )。一方, OE 群の糞中ムチン濃度は, Control 群と比較して, 有意に増加した。このことからカキ肉エキスを 4 週間摂取することで, マウスの糞中ムチン濃度が増加することが示唆された。

カキ肉エキス餌料の給餌による糞中ムチン濃度の増加は, 腸内の *Muc* 遺伝子の発現増加が関与している可能性がある。そのため, 回腸および大腸末端における *Muc1* および *Muc2* 遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で分析した。

**Table 3** Growth parameters of mice fed the experimental diets

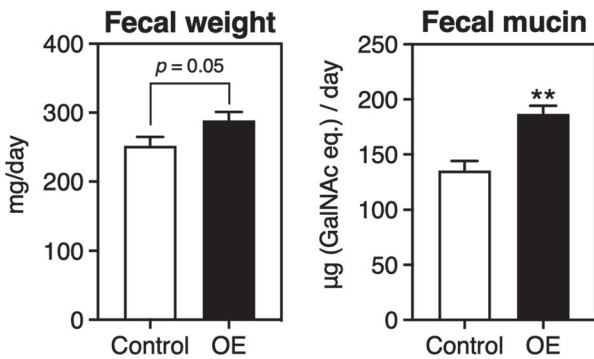
	Experimental groups	
	Control	OE
Growth parameters		
Initial BW (g)	18.4 ± 0.4	18.7 ± 0.4
Final BW (g)	24.3 ± 0.4	24.7 ± 0.6
BW gain (g/day)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02
Food intake (g/day)	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1
Organ weights (g/100g BW)		
Spleen	78.0 ± 4.0	71.0 ± 1.3

Values are shown as mean and standard error (n = 10). BW, body weight; OE, oyster-extract.

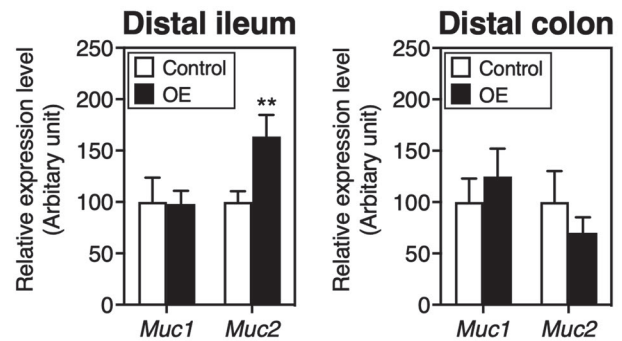
Fig. 2に、回腸 (A) および大腸 (B) 末端の *Muc1* および *Muc2* 発現量を示した。回腸末端において、OE 群の *Muc2* 発現量は、Control 群と比較して、有意に増加した。一方、回腸末端の *Muc1*、大腸末端の *Muc1* および *Muc2* 発現量には、両群間で有意な差はなかった。*Muc2* は小腸および大腸で高発現している分泌型ムチン遺伝子の一つである<sup>19)</sup>。*Muc2* によって生合成されるムチンは、多量に付加される *O*-結合型糖鎖によって粘性を生じ、腸管上皮細胞の表面の糖鎖と結合し、腸内細菌に対して競合的に結合することにより、生体内への侵入あるいは上皮細胞への接着を防いでいる。*Muc2* ノックアウトマウスでは、腸上皮細胞に細菌が直接接触するために炎症を惹起し、最終的に大腸がんを自然発症することが報告されている<sup>20)</sup>。したがって、*Muc2* 発現量の増加は、OE 群で観察された糞中ムチン濃度の増加の一因であり、腸バリア機能向上につながると考えた。一方、ムチン産生を亢進させたトランスジェニックマウスを用いた研究では、ムチン層がより強固になり、回腸の *Lactobacillus* 属が有意に多く保有されることが報告されている<sup>21)</sup>。我々はこれまでに、カキ肉エキスの給餌は、マウスの糞中 *Lactobacillus* 属の構成比率を

高脂肪および低脂肪餌料条件下のどちらにおいても増加させることを報告している<sup>8)</sup>。したがって、カキ肉エキスの給餌による回腸 *Muc2* 発現量の亢進は、腸内の *Lactobacillus* 属の構成比率の増加と関連している可能性がある。

糞中ムチン濃度および回腸 *Muc2* 発現量の増加に関与するカキ肉エキス中の成分を同定するため、人工消化試験を行い、消化管下部まで到達する可能性の高い難消化性残渣の生成率およびこの一般成分組成分析を行った。Table 4 に、人工消化試験における模倣カキ肉エキスおよびカキ肉エキスの難消化性残渣生成率および難消化性残渣の一般成分組成を示した。脂質量は、模倣カキ肉エキスおよびカキ肉エキスともに、0 に近く正確な値を求めることが困難であったため、本実験では両サンプルともに 0 とした (データ未掲載)。難消化性残渣生成率は、両試料間で有意な差はなかった。難消化性残渣の一般成分組成において、カキ肉エキスの難消化性残渣は、模倣カキ肉エキスの難消化性残渣と比較して、灰分およびたんぱく質量が有意に低く、炭水化物量が有意に高かった。そのため、カキ肉エキスに含まれる炭水化物は、模倣カキ肉エキスよりも消化管下部



**Fig. 1** Fecal weight and mucin excretion of mice fed the experimental diets. Values are shown as mean and standard error shown by vertical bars based on 10 determinations. Asterisks indicate statistically significant differences from rats fed the casein diet: Student's *t*-test, \*\**p* < 0.01. OE, oyster-extract.



**Fig. 2** Relative *Muc1* and *Muc2* expression level in the distal ileum and colon of mice fed the experimental diets. Values are shown as mean and standard error shown by vertical bars based on 10 determinations. Asterisks indicate statistically significant differences from rats fed the casein diet: Student's *t*-test, \*\**p* < 0.01. OE, oyster-extract.

**Table 4** Production rate and nutritional composition of indigestible residues

	Imitation OE	OE
Production rate of indigestible residue (%)	14.0 ± 1.2	14.1 ± 0.7
Nutritional composition of indigestible residue (g/100g)		
Water	4.6 ± 0.2	4.2 ± 0.3
Ash	3.6 ± 0.7	1.3 ± 0.4 **
Crude protein	35.8 ± 3.1	14.1 ± 1.1 **
Carbohydrate	56.1 ± 2.6	80.4 ± 0.8 **

Values are shown as mean and standard error (n = 10). Asterisks indicate statistically significant differences from rats fed the casein diet: Student's *t*-test, \*\**p* < 0.01. OE, oyster-extract.



まで到達すると考えた。カキ肉エキスに含まれる主な高分子の炭水化物はグリコーゲンである。これまでに、水溶性、水溶液の粘度、分子量、微細構造、形状など、天然由来グリコーゲンと同様の化学構造および物性を持っている酵素合成グリコーゲン<sup>22)</sup>には、難消化性部が存在しており、マウスに給餌すると腸内の短鎖脂肪酸濃度が向上することが報告されている<sup>23)</sup>。グリコーゲンの難消化性部は、食物繊維やレジスタントスターチと同様の効果を発揮すると考えられる。これまでに、粘性が高い水溶性食物繊維は、小腸でのムチン分泌の促進作用を示すこと<sup>24)</sup>、またレジスタントスターチの給餌は、*Muc2*発現量上昇を介して粘膜バリアの調節に関わっていることが報告されている<sup>25)</sup>。これらのことから、カキ肉エキス中の回腸 *Muc2* 発現量亢進に関与する成分として、グリコーゲンが考えられる。しかし、今後、カキ肉エキスから抽出・精製したグリコーゲンをマウスに投与して、回腸 *Muc2* 発現量に及ぼす影響を評価する必要があると考える。

以上のことから、カキ肉エキスの摂取は、マウスの回腸 *Muc2* 発現量亢進を介して、ムチン分泌の促進することで腸のバリア機能を向上させることが示唆された。また、カキ肉エキスに含まれるグリコーゲンが、回腸 *Muc2* 発現量亢進に関与している可能性が示された。

## 文 献

- 1) 松田芳和 (2008) 牡蠣亜鉛の性質とその栄養有効性。ミネラルの科学と最新応用技術 (糸川嘉則)。シーエムシー出版、東京：pp.124-135.
- 2) 吉田宗弘、平田登、木谷祥子、松田芳和 (2002) 牡蠣から調製した亜鉛濃縮物の性質。微量栄養素研究 19：43-46.
- 3) 辻貴之、菊池祐子、中塚千晶、木谷祥子、福永健治、西山利正、松田芳和、吉田宗弘 (2001) 牡蠣の酸可溶性画分に含有される亜鉛の栄養有効性。微量栄養素研究 18：63-66.
- 4) 久保道徳、松田秀秋、田村崇子、高津政雄 (1980) バランスター [カキ *Crassostrea gigas* (THUNBERG) の肉エキス] の実験的肝障害に対する予防および肝機能改善作用。基礎と臨床 14: 1437-1442.
- 5) Hosomi R, Matsuda Y, Ishimaru A, Takemura S, Fukunaga K, Yoshida M (2007) Effect of dietary oyster extract on the colonic aberrant crypt foci in mice. Trace Nutrients Research 24: 71-75.
- 6) Hosomi R, Matsuda Y, Watanabe Y, Fukunaga K, Yoshida M (2008) Effect of dietary oyster extract on the p-aminophenol-induced nephrotoxicity in rats. Trace Nutrients Research 25: 91-95.
- 7) 池田祐生、細見亮太、松田芳和、新井博文、下埜敬紀、神田靖士、西山利正、吉田宗弘、福永健治 (2018) カキ肉エキスの給餌によるラットの盲腸内細菌叢の変化。微量栄養素研究 35：41-46.
- 8) 中村潤平、池田祐生、細見亮太、石田達也、松井博之、松田芳和、下埜敬紀、神田靖士、西山利正、吉田宗弘、福永健治 (2019) カキ肉エキスの給餌がマウスの糞中細菌叢および短鎖脂肪酸組成に及ぼす影響。微量栄養素研究 36：21-28.
- 9) Ishida T, Matsui H, Matsuda Y, Shimono T, Kanda S, Nishiyama T, Hosomi R, Fukunaga K, Yoshida M (2022) Dietary Oyster (*Crassostrea gigas*) Extract Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Chronic Experimental Colitis by Improving the Composition of Gut Microbiota in Mice. Foods 11: 2032.
- 10) Ishida T, Matsui H, Matsuda Y, Hosomi R, Shimono T, Kanda S, Nishiyama T, Fukunaga K, Yoshida M (2022) Oyster (*Crassostrea gigas*) Extract Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Experimental Colitis by Improving Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids Compositions in Mice. Foods 11: 373.
- 11) Kurashima Y, Kiyono H (2017) Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. Annu Rev Immunol 35: 119-147.
- 12) Seikrit C, Pabst O (2021) The immune landscape of IgA induction in the gut. Semin Immunopathol. 43: 627-637.
- 13) Johansson ME, Hansson GC (2016) Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. Nat Rev Immunol 16: 639-649.
- 14) Ito H, Wada T, Ohguchi M, Sugiyama K, Kiriya S, Morita T (2008) The degree of polymerization of inulin-like fructans affects cecal mucin and immunoglobulin A in rats. J Food Sci 73: H36-H41.
- 15) Taira T, Yamaguchi S, Takahashi A, Okazaki Y, Yamaguchi A, Sakaguchi H, Chiji H (2015) Dietary polyphenols increase fecal mucin and immunoglobulin A and ameliorate the disturbance in gut microbiota caused by a high fat diet. J Clin Biochem Nutr 57: 212-216.
- 16) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. J Nutr 123: 1939-1951.
- 17) Lucas-González R, Viuda-Martos M, Pérez Álvarez JA, Fernández-López J (2018) Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during in vitro gastrointestinal

- digestion. *Food Chem* 256: 252–258.
- 18) Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MS, Weitschies W, Brodtkorb A (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* 5: 1113–1124.
  - 19) Weiss AA, Babyatsky MW, Ogata S, Chen A, Itzkowitz SH (1996) Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. *J Histochem Cytochem* 44: 1161–1166.
  - 20) Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L (2002) Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295: 1726–1729.
  - 21) Gouyer V, Dubuquoy L, Robbe-Masselot C, Neut C, Singer E, Plet S, Geboes K, Desreumaux P, Gottrand F, Desseyn JL (2015) Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci Rep* 5: 9577.
  - 22) Kajiura H, Takata H, Kuriki T, Kitamura S (2010) Structure and solution properties of enzymatically synthesized glycogen. *Carbohydr Res* 345: 817–824.
  - 23) Furuyashiki T, Takata H, Kojima I, Kuriki T, Fukuda I, Ashida H (2011) Metabolic fate of orally administered enzymatically synthesized glycogen in rats. *Food Funct* 2: 183–189.
  - 24) Ito H, Satsukawa M, Arai E, Sugiyama K, Sonoyama K, Kiriya S, Morita T (2009) Soluble fiber viscosity affects both goblet cell number and small intestine mucin secretion in rats. *J Nutr* 139: 1640–1647.
  - 25) Jimenez JA, Uwiera TC, Abbott DW, Uwiera RRE, Inglis GD (2016) Impacts of resistant starch and wheat bran consumption on enteric inflammation in relation to colonic bacterial community structures and short-chain fatty acid concentrations in mice. *Gut Pathog* 8: 67.