

ヌクレオチド摂取が哺乳期および離乳期ラットの消化管成熟に及ぼす影響

(平成11年7月15日受付, 平成11年10月7日受理)

雪印乳業(株)栄養科学研究所

佐藤 則文・中埜 拓・菅原 牧裕・井戸田 正

Key Words : ヌクレオチド, 消化管の成熟, 哺乳期ラット, 離乳期ラット

要 旨

哺乳期ラットおよび通常食と低タンパク質食を与えた離乳期ラットの消化管成熟に及ぼすヌクレオチドの効果を小腸粘膜の重量やタンパク質含量, マルターゼ活性, ラクターゼ活性さらにはマルターゼ/ラクターゼ比の変化を指標として検討した。

哺乳期ラットを用いた場合, ヌクレオチド群でラクターゼ活性は低下し, マルターゼ活性は上昇する傾向にあった。また, マルターゼ/ラクターゼ比は有意に上昇した。離乳期ラットを用いた場合, 通常タンパク質食では小腸粘膜重量やマルターゼ/ラクターゼ比はヌクレオチド群で有意に上昇し, ラクターゼ活性は低下した。一方, 低タンパク質食では, 有意な差は見られなかったが, 通常タンパク質食の場合と同様の傾向が見られた。

従って, 消化管が未熟な時期にヌクレオチドを摂取することは消化管の成熟にとって有用であると考えられるが, その効果については摂取期間などの影響も含めて今後さらに検討する必要があると考えられた。

緒 言

近年, 食餌から摂取したヌクレオチドの栄養学的な役割が見直されつつあり, ブドウ球菌に対する感染抵抗性の向上やナチュラルキラー細胞の活性化といった免疫系への影響¹⁾²⁾, 赤血球膜や脳内のドコサヘキサエン酸, アラキドン酸さらにはリン脂質が増加するといった脂質代謝系への影響³⁾⁴⁾が報告されている。また, ヌクレオチドを強化した調製粉乳を摂取すると乳児の発育が促進されるとの報告⁵⁾もあり, ヌクレオチドは準必須栄養素と考えられるようになってきた⁶⁾。

一方, 腸管上皮細胞の代謝回転は速く, ヒトやラットの腸管上皮細胞では3~5日ですべての細胞が入れ代わることから⁷⁾⁸⁾, DNAやRNAの合成に多くのヌクレオチドを必要とする。しかし, これらの細胞ではヌクレオチドのde novo合成系が制限状態にあるため, 外部(食

餌)からヌクレオチドが供給されないと細胞の増殖, 分化に様々な影響を及ぼす可能性が指摘されている⁶⁾⁹⁾。実際, 離乳後のラットや慢性下痢を発症したラットにヌクレオチドを摂取させると消化管粘膜の重量やタンパク質含量が増加すること, さらに二糖類分解酵素活性が上昇することから, 食餌由来のヌクレオチドは腸管上皮細胞の発達に重要な成分と考えられるようになってきた¹⁰⁾¹¹⁾。

しかしながら, 消化管が未熟な状態にある哺乳期のラットや乳汁から固形食へと大きな変化を遂げる離乳期のラットを対象に, 消化管の発達や成熟に関して検討した報告はほとんど見当たらない。そこで, 本研究では, ヌクレオチドを哺乳期および離乳期ラットに投与し, 消化管の成熟に及ぼす効果について, 粘膜重量やラクターゼ, マルターゼ活性, マルターゼ/ラクターゼ比を指標に検討を行った。さらに離乳期ラットについては, 通常タンパク質食(20%タンパク質食)だけでなく, 低タンパク質食(10%タンパク質食)を与えた栄養的制限下でのヌクレオチドの効果についても検討を行った。

別刷請求先: 〒350-1165 埼玉県川越市南台1-1-2
雪印乳業(株)栄養科学研究所
佐藤 則文

なお、哺乳期ラットを用いた場合には母ラットの母乳から摂取するヌクレオチド量も把握しておく必要があると思われたので、ラットの母乳中のヌクレオチド分析もあわせて行った。

実験方法

1. ラット母乳の採取方法とヌクレオチド分析方法

ラット母乳の採取は、高橋らの方法に従って、ネンブタール麻酔下、オキシトシン (Sigma) を 5 IU 腹腔内に投与した後、手搾りで母乳を採取した¹²⁾。

ヌクレオチド分析のための試料調製は以下のように行った。すなわち、母乳サンプル 5 ml に 10% トリクロロ酢酸 (TCA) を加えてから 30 分ほど冷却し、3,000Xg, 15分, 4°C で遠心分離を行った。水層部を分取し、クリームと沈殿部には再度 TCA を加えて同様の操作を行った。水層部を混合し、20 ml のジエチルエーテルで TCA を除去した後、凍結乾燥を行ってヌクレオチド分析サンプルを調製した。またヌクレオチド分析は、Sugawara らの HPLC 法に従った¹³⁾。

2. 哺乳期ラットを用いた消化管の成熟試験

SD 系新生仔ラット (日本チャールスリバー, 雄) を 5 日齢で購入し、7 日齢から実験を開始した。仔ラットはヌクレオチド投与群 (n=5) と生理食塩水投与群 (n=5) の 2 群に分け、実験期間中は母親に飼育させた。ヌクレオチド組成は、人乳の組成に近似して CMP:UMP:AMP:IMP:GMP=10:1:1:1:1 とし¹³⁾、1 日あたり 1.0mg のヌクレオチドを朝、夕の 2 回に分けて毎日経口強制投与した。この投与量は、ラット母乳の分析結果からラットが一日に母乳から摂取する量とほぼ同じ量とした。ヌクレオチドの投与開始後、8 日目 (生後 15 日齢) にラットを解剖し、臓器重量を測定した後、スライドグラスで小腸粘膜を採取した。粘膜は十分にホモジナイズした後、生理食塩水で 10 ml に調製して分析用の粘膜ホモジネートとして冷凍保存した。

3. 離乳期ラットを用いた消化管の成熟試験

SD 系新生仔ラット (日本チャールスリバー, 雄) を 14 日齢で購入した。17 日齢で強制離乳させ、1.0%ヌクレオチド添加食群 (n=5) と無添加食群 (コントロール群, n=5) の 2 群に分け、表 1 に示した通常食 (20%タンパク質) でラットを飼育した。なお、ヌクレオチド無添加食にはヌクレオチドは全く含まれていなかった。摂取開始後 8 日目 (生後 25 日齢) にラットを解剖し、臓器重量を測定した後、哺乳期ラットの場合と同様に小腸粘膜ホモジネートを調製した。

一方、低タンパク質食 (10%タンパク質食) を与えた

表 1 Composition of the Experimental Diets (20% protein diet)

Ingredient	Diets(g/kg diet)	
	Control	Nucleotides
Casein	200	200
Cornstarch	585	575
Sucrose	30	30
Cellulose	80	80
Soybean oil	60	60
Mineral mixture ^a	35	35
Vitamin mixture ^a	10	10
Nucleotides mixture ^b	-	10

^a AIN-76 mineral mixture and vitamin mixture contained 20% of choline bitartrate.

^b CMP:UMP:IMP:AMP:GMP=10:1:1:1:1 in weight.

CMP;cytidine 5-monophosphate, UMP;uridine 5-monophosphate, IMP;inosine 5-monophosphate, AMP;adenosine 5-monophosphate, GMP;guanosine 5-monophosphate.

場合もすべて上記と同様に実験を行った。

4. 小腸粘膜の分析

粘膜のたんぱく質含量は Lowry 法で測定した¹⁴⁾。二糖類分解酵素活性 (ラクターゼおよびマルターゼ活性) は、0.056 M (リン酸緩衝液, pH 6.1) に調製したラクトース、マルトースを基質として、この溶液 100 μ l に粘膜ホモジネート 20 μ l を加えて 37°C で 30 分間反応させ、反応液中に生成したグルコース量をテストキット (和光純薬製) を用いて測定した。

5. 統計処理

結果は平均値 \pm SD (標準偏差) で表した。有意差検定は、Super ANOVA を使用して分散分析後、Student-t 検定を行った。

実験結果

1. ラット乳中のヌクレオチド含量

ラット乳中のヌクレオチド含量を表 2 に示した。ラット母乳 1 ml あたり 81 μ g のヌクレオチドが含まれていた。また、CMP が全体の約 70% を占め、ヒトの母乳と同様に主要な成分であった。ヌクレオチドの組成比も、ヒトの母乳の比率 (CMP:UMP:AMP:IMP:GMP=10:1:1:1:1) に近かった。

2. 哺乳期ラットの消化管成熟に及ぼすヌクレオチドの効果

ラットの体重変化、臓器重量、小腸粘膜重量およびタンパク質含量について表 3 に示したが、いずれの値にも有意な差は認められなかった。また、二糖類分解酵素活性を図 1 に示した。有意な差は認められなかったが、ヌ

表2 Content composition of nucleotides in rat milk

	CMP	UMP	IMP	AMP	GMP	Total
Rat milk (μ g/ml)	56.0	6.4	6.5	6.1	6.2	81.2
Composition (%)	69.0	7.9	8.0	7.5	7.6	100.0

表3 Effects of nucleotides on body weight gain, organs weight and mucosal weight of suckling and early weaned rats

	Suckling rats		Early weaned rats (20% protein)		Early weaned rats (10% protein)	
	Control	Nucleotides	Control	Nucleotides	Control	Nucleotides
Initial body weight(g)	17.0 \pm 0.7	17.5 \pm 0.7	42.0 \pm 1.1	41.0 \pm 2.6	41.1 \pm 2.1	40.7 \pm 1.2
Final body weight(g)	41.0 \pm 1.4	42.2 \pm 1.6	75.3 \pm 1.9	77.2 \pm 2.2	47.4 \pm 3.1	45.1 \pm 1.0
Total body weight gain(g)	23.8 \pm 1.5	24.5 \pm 1.8	34.3 \pm 1.7	36.2 \pm 3.8	6.3 \pm 3.6	4.4 \pm 1.2
Organs weight(g)						
Liver	1.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	3.4 \pm 0.2	3.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.0
Intestine	1.6 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	3.3 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2
Intestinal mucosa(g)	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	1.6 \pm 0.4	2.4 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3
Protein(mg/ml homogenate)	8.7 \pm 0.6	9.0 \pm 0.5	25.8 \pm 3.3	31.1 \pm 5.0	7.6 \pm 0.5	7.5 \pm 0.6

Values are means \pm SD (n=5) *p < 0.05 vs control group

クレオチド群でラクターゼ活性が低下し、マルターゼ活性が上昇する傾向にあった。マルターゼ/ラクターゼ比はヌクレオチド群で有意に上昇した。

3. 離乳期ラットの消化管の成熟化に及ぼすヌクレオチドの効果

通常タンパク質食および低タンパク質食を摂取した早期離乳ラットの消化管成熟に及ぼすヌクレオチドの効果について、体重変化、臓器重量、小腸粘膜重量およびタンパク質含量を表3に、二糖類分解酵素活を図1に示した。

通常タンパク質食の場合、小腸粘膜重量、タンパク質含量はヌクレオチド群で高値を示した。また、マルターゼ/ラクターゼ比はヌクレオチド群で有意に上昇し、ラクターゼ活性はヌクレオチド群で有意に低下した。

一方、低タンパク質食の場合、粘膜の酵素活性に有意な変化は認められなかったが、哺乳期や通常タンパク質食を摂取した離乳期ラットと同様の傾向を示した。

考 察

ヒトの母乳には、約5~11 μ g/mlのヌクレオチドが含まれている¹³⁾。その組成はCMPが全体の70%以上含まれており、他のヌクレオチドは少ないという特徴を有する。このような特徴にどのような意義があるのかは十分に明らかとはなっていないが、ヒト結腸癌細胞由来Caco-2やラット小腸上皮細胞由来IEC-6を用いて細胞増殖、分化に及ぼすヌクレオチドの効果を調べた結果で

は、CMPが細胞増殖や分化を最も促進することが報告されている¹⁵⁾。今回、ラット母乳のヌクレオチドを分析したところ、含量はヒト母乳の約10倍のヌクレオチドが含まれていたが、その組成はほとんどヒトの母乳と同じで、CMPが最も多く含まれていることが明らかとなった。従って、人乳に含まれるヌクレオチドの役割・機能を研究する際にラットを用いることは有効であると考えられた。そこで今回我々は、ヌクレオチドが哺乳期および離乳期ラットの消化管の成熟に及ぼす効果について、小腸粘膜重量やタンパク質含量さらにはラクターゼ、マルターゼ活性、マルターゼ/ラクターゼ比の変化を指標として検討した。

哺乳期のラットを用いた場合、消化管成熟の指標となるマルターゼ/ラクターゼ比がヌクレオチド群で有意に上昇した。さらに、ラクターゼ活性は低下し、マルターゼ活性は上昇する傾向にあった。従って、ヌクレオチドは哺乳期ラットの消化管成熟を促進する可能性が示唆された。

離乳期以降では、ラットにヌクレオチドを2週間摂取させることで小腸粘膜重量が増加することやマルターゼ活性、マルターゼ/ラクターゼ比が上昇し、腸管成熟が促進されることが報告されている¹⁶⁾。今回の通常タンパク質食摂取時の早期離乳ラットにおいてもヌクレオチドを摂取させることで、小腸粘膜の重量やマルターゼ/ラクターゼ比が有意に増加し、ラクターゼ活性が低下した。従って、ヌクレオチドは離乳期ラットの腸管上皮細

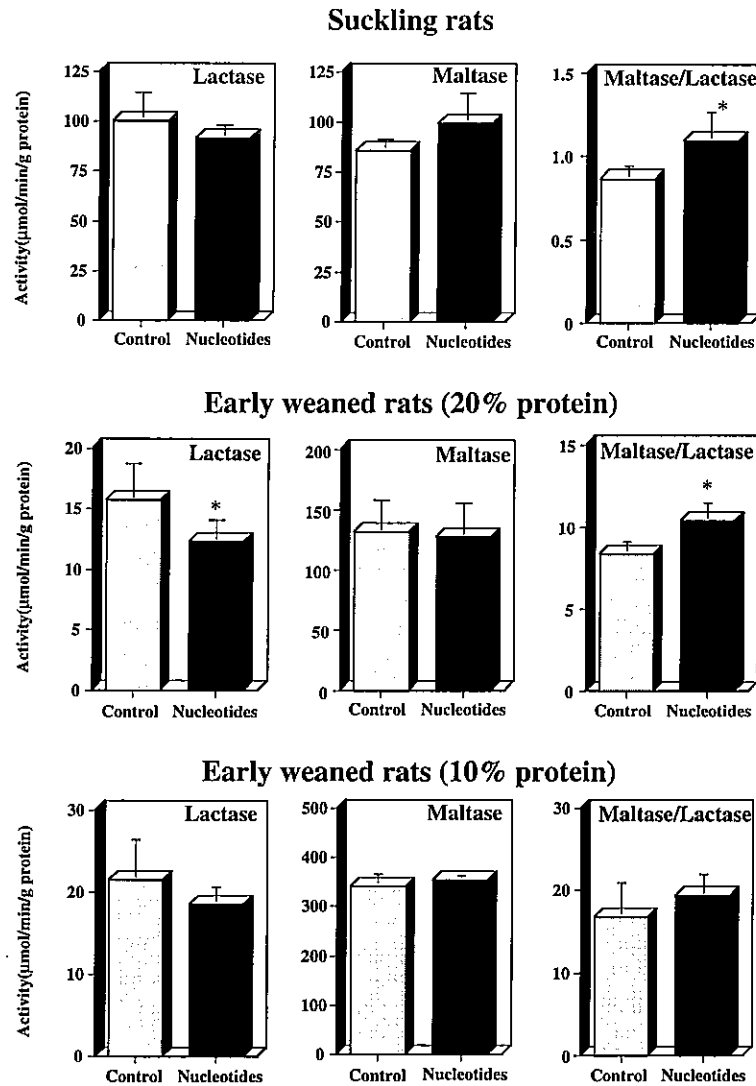


図1 Effects of nucleotides on lactase and maltase activity, and maltase/lactase ratio of intestinal mucosa in suckling and early weaned rats
Values are means \pm SD (n=5), * p <0.05 vs control group

胞の増殖や成熟を促進する可能性が示唆された。

一方、ラクトースで慢性的な下痢を発症した場合¹¹⁾¹⁶⁾や静脈栄養¹⁷⁾あるいは食餌制限¹⁸⁾のように栄養的なストレス下のラットにヌクレオチドを投与すると小腸粘膜重量やタンパク質含量が増加すること、粘膜のマルターゼやスクラーゼ活性が上昇すること、絨毛の高さが増加することなども報告されている。今回我々も、低タンパク質食を早期離乳ラットに与えることにより栄養的ストレス下におけるヌクレオチドの効果について検討した。傾向的にはラクターゼ活性の低下やマルターゼ/ラクターゼ比の増加が見られ、低タンパク質食摂取時のような栄

養的制限下でもヌクレオチドは消化管の成熟を促進する可能性が示唆されたが、その効果はわずかであった。これはヌクレオチドの効果に比して、タンパク質の影響が大きすぎるためと考えられた。

成長期のラットの消化管は常に新しい細胞を作り出すために多くのヌクレオチドを必要とする。これに対して、腸管上皮細胞のプリン・ピリミジン合成能は低いため食餌からヌクレオチドを摂取しないと腸管の発達にマイナスとなりうると思われる⁹⁾。さらに、骨髄、脳細胞、赤血球などでも de novo 合成を十分に行えず、salvage 合成に依存する割合が高いことから、哺乳期あ

るいは離乳期には、食餌から十分のヌクレオチドを摂取する必要があると考えられた。

また、これまでヌクレオチドの投与期間については、離乳後ラットでは2週間¹⁰⁾、早期離乳ラットでは3日間¹⁰⁾、また5日間の絶食後のラットでは3日間ヌクレオチドを投与する¹⁰⁾ことで消化管の成熟が促進されることが報告されている。今回の結果もヌクレオチドを8日間摂取することで粘膜重量や二糖類分解酵素活性に影響を及ぼした。今後、粘膜中のDNA量の評価などを行うことも必要かもしれない。また、摂取期間が長くなるとヌクレオチドの効果が見られなくなることや、消化管細胞は代謝回転が速く、3～5日ですべての細胞が入れ代わることなどを考慮すれば、ヌクレオチドは比較的短時間で消化管の成熟に影響を及ぼすと考えられた。従って、摂取期間の影響について今後さらに検討する必要があると考えられた。

以上のように、哺乳期および通常タンパク質食、低タンパク質食を摂取した離乳期ラットを用いた検討から、従来栄養成分と見なされていなかったヌクレオチドが未熟な消化管の成熟を促進する可能性が示唆された。哺乳期から離乳期にかけて消化管は非常に大きな変化を遂げることから、この時期にヌクレオチドを摂取することは乳仔の消化管の発達にとって有用であると考えられた。しかし、どの時期にどの程度のヌクレオチドを摂取すべきか、あるいはこのような消化管の変化が哺乳期や離乳期ラットのタンパク質、糖質、脂質の消化吸収能に及ぼす影響については十分に明らかにされていないことから、今後この点も含めて検討すべきと考えられた。さらには、絨毛や微絨毛などの形態的な変化に及ぼす影響、乳児の腸管機能への影響についても検討すべき課題であると考えられた。

結 論

哺乳期および離乳期ラットの消化管成熟に及ぼすヌクレオチドの効果について検討し、以下のような結果を得た。

1) 哺乳期ラットにヌクレオチドを投与したところ、腸粘膜重量や粘膜中のタンパク質含量に変化は見られなかったが、ラクターゼ活性が低下し、マルターゼ活性が上昇する傾向が見られた。また、マルターゼ/ラクターゼ比はヌクレオチド群で有意に上昇し、哺乳期ラットの消化管成熟を促進する可能性が示唆された。

2) 離乳期ラットにヌクレオチドを摂取させると、通常食では小腸粘膜重量やラクターゼ活性が有意に低下し、マルターゼ/ラクターゼ比も有意に上昇した。低タンパ

ク質食では、有意な変化は認められなかったが、酵素活性の変化からヌクレオチドは消化管の成熟を促進する可能性が示唆された。

以上の結果から、食餌由来のヌクレオチドは哺乳期および離乳期の未熟な消化管の発達に有用であると考えられるが、その効果については、摂取期間などの影響も含めて今後さらに検討すべきであると考えられた。

文 献

- 1) Carver JD, Cox WI, Barness LA : Dietary nucleotide effects upon murine natural killer cell activity and macrophage activation. JPEN 1990;14:18-22.
- 2) Adjei AA, Takamine F, Yokoyama H, Shiokawa K, Matsumoto Y, Asato L, Shinjo S, Imamura T, Yamamoto S: The effects of oral RNA and intraperitoneal nucleoside - nucleotide administration on methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice. JPEN 1993; 17 : 148-152.
- 3) Pita ML, Fernandez MR, De - Lucchi C, Medina A, Martinez-Valverde A, Uauy R, Gil A : Changes in the fatty acids pattern of red blood cell phospholipids induced by type of milk, dietary nucleotide supplementation, and postnatal age in preterm infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1988 ; 7 : 740-747.
- 4) Sato N, Murakami Y, Nakano T, Sugawara M, Kawakami H, Idota T, Nakajima I : Effects of dietary nucleotides on lipid metabolism and learning ability of rats. Biosci Biotech Biochem 1995 ; 59 : 1267- 1271.
- 5) Cosgrove M, Davies DP, Jenkins HR : Nucleotide supplementation and the growth of term small for gestational age infants. Arch Dis Child 1996 ; 74 : F122-F125.
- 6) Uauy R : Dietary nucleotides and requirements in early life. In : Lebenthal E, editor, Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy, Raven Press, New York, 1989; 265-280.
- 7) Cairnie AB, Lamerton Lf, Steel GG : Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters. Exp Cell Res 1965 ; 39 : 528-538.
- 8) Cairnie AB, Lamerton Lf, Steel GG : Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat.II. Theoretical aspects. Exp Cell Res 1965 ; 39 : 539-553.
- 9) He Y, Chu SW, Walker WA : Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells. J Nutr 1993 ; 123 : 1017-1027.
- 10) Uauy R, Stringel G, Thomas R, Quan R : Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1990 ; 10 : 497-503.

- 11) Nunez MC, Ayudarte MV, Morales D, Suarez MD, Gil A : Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. JPEN 1990 ; 14 : 598-604.
- 12) 高橋利一, 平林真澄, 関口淳子, 上田正次: 泌乳期ラットからの乳汁回収. 実験動物技術 1996 ; 31 : 123-130.
- 13) Sugawara M, Sato N, Nakano T, Idota T, Nakajima I : Profile of nucleotides and nucleosides of human milk. J Nutr Sci Vitaminol 1995 ; 41 : 409-418.
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurements with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951 ; 193 : 265-275.
- 15) Sato N, Nakano T, Kawakami H, Idota T : In vitro and in vivo effects of exogenous nucleotides on the proliferation and maturation of intestinal epithelial cells. J Nutr Sci Vitaminol 1999 ; 45 : 107-118.
- 16) Bueno J, Torres M, Almendros A, Carmona R, Nunez MC, Rios A, Gil A : Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhea. Histological and ultrastructural changes. Gut 1994 ; 35 : 926-933.
- 17) Tsujinaka T, Iijima S, Kido Y, Homma T, Ebisui C, Kan K, Imamura I, Fukui H, Mori T : Role of nucleosides and nucleotide mixture in intestinal mucosal growth under total parenteral nutrition.
- 18) Ortega MA, Nunez MC, Gil A, Sanchez-Pozo A : Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old rats. J Nutr 1995 ; 125 : 1413-1418.

Effects of nucleotides on the intestinal maturation in suckling and early weaned rats

Nutritional Science Laboratory, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

Norifumi SATO, Taku NAKANO, Makihiko SUGAWARA, Tadashi IDOTA

To determine the nutritional significance of nucleotides, the effects of nucleotides on the intestinal maturation were investigated in suckling rats and early weaned rats, fed 20% protein or low protein diet. Nucleotides were orally administered to suckling rats for 8 days, and 20% or low protein diet supplemented with 1.0% nucleotides were given to early weaned rats for 8 days. Intestinal mucosal weight, protein content, lactase, maltase activity and maltase/lactase ratio were evaluated as the markers of intestinal growth and maturation. Nucleotides significantly enhanced maltase/lactase ratio in suckling rats, although they did not influence mucosal weight and protein content. On the other hand, nucleotides significantly enhanced mucosal weight and maltase/lactase ratio in early weaned rats fed 20% protein. In rats fed low protein diet, lactase tended to be lower and maltase/lactase ratio tended to be higher in nucleotide group, but not significant.

These results suggest that nucleotides may enhance the intestinal maturation of suckling and weanling rats whose intestine is immature. Further studies should be required to clarify the effects of feeding period of nucleotides, but nucleotides may play an important role in the intestinal development in infancy.