

学位論文

ープロバイオティクスの整腸効果ー ヒトにおけるヨーグルトの形態での 日常的摂取条件下での影響評価に関する研究

-Improvement effects of probiotics on enteral environments-

Assessments under the conditions of daily intake as yogurt in humans

2013. 3

西田 聡

目次

略語

本文

第 I 章	序論	1
第 II 章	<i>Bifidobacterium lactis</i> の整腸効果の評価	
第 1 節	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 の整腸効果と摂取量依存性および過剰量摂取時の安全性の評価	11
第 2 節	<i>Bifidobacterium lactis</i> DN173010 のヨーグルト摂取ヒト無作為化比較試験での腸管通過時間を中心とした整腸効果の評価	44
第 III 章	<i>Lactobacillus paracasei</i> KW3110 のプロバイオティクス活性と整腸効果の評価	63
第 IV 章	総括	83
要約		92
キーワード		94
謝辞		95
引用文献		96

略語

BB-12:	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12
BMI:	Body mass index (ボディーマス指数)
BSA:	Bovine Serum Albumin (ウシ血清アルブミン)
Caco-2:	Caco-2 cell (ヒト結腸ガン由来株化細胞 Caco-2 細胞)
cfu:	Colony forming unit (コロニー形成単位)
DAPI:	4', 6-Diamino-2-Phenylindole (4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール)
DN173010:	<i>Bifidobacterium lactis</i> DN173010
ECP:	Eosinophil Cationic Protein (好酸球カチオンタンパク質)
FTT:	Fast Transit Time (腸管通過時間が短い集団)
HT29:	HT-29 cell (ヒト結腸ガン由来株化細胞 HT-29 細胞)
IL-4:	Interleukin-4 (インターロイキン 4)
IL-12:	Interleukin-12 (インターロイキン 12)
KW3110:	<i>Lactobacillus paracasei</i> KW3110
MRS:	de Man, Rogosa and Sharpe (MRS 培地)
PBS:	Phosphate Buffered Saline (リン酸塩緩衝食塩水)
QOL:	Quality of life (生活の質)
Q _t -PCR:	Quantitative Polymerase Chain Reaction (定量 PCR)
RCT:	Randomized Controlled Trial (無作為化比較試験)
SCFA:	Short Chain Fatty Acid (短鎖脂肪酸)
STT:	Slow Transit Time (腸管通過時間が長い集団)
Th1:	Th1 cell (Th1 細胞)
Th2:	Th2 cell (Th2 細胞)

第 I 章 序論

近年日本では高齢化が急速に進行している。年齢が高くなれば健康面の懸念も増え、それに伴い健康長寿へのニーズも社会全体のレベルで高まっている。例えば、メタリックシンドロームへの関心の高まり、先進医療への注目、栄養や食習慣に関する豊富な話題などから、それをうかがい知ることが出来る。

高齢化とともに生活習慣の変化も話題に取り上げられることが多い。例えば、運動不足、ストレス、食習慣の日本古来のスタイルから欧米スタイルへの移行が顕著であることなどが、生活習慣病との関係さらには健康全体への懸念に影響を与える主要な因子となっている。

高齢社会の中で生活習慣の視点で健康を見ると、食習慣が重要な位置にある。食事は日常生活の中で毎日行うことであり、得られる栄養素は日常活動のエネルギーかつ体を構成する材料となる。また、何をどのように食べるか、ということが大切だということも、明白な共通理解である。最近の日本では、食習慣の欧米化が著しいと言われ、食物繊維が少なく、高たんぱく質、高脂質のものが増えてきている。この事は肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧、さらには癌といった生活習慣病との関連が指摘され、社会的な問題である一方、日常生活の「食」の場面での大きな関心の一つでもある。このような関心に、科学的なエビデンスを基に答えることが期待されている。機能性食品といわれる食品は、この期待に応えるべく近年研究が活性化している分野である。すなわち、顕著な生理的有効性を備えた食品成分を含み、ヒトが食品として摂取した際に有効性を発揮する形で一般に提供し、社会的に貢献しようとするものである。

「食」の場面で健康を考えると、ただ単に食品にどのような栄養成分が含まれているかのみならず、摂取した食餌をどのように消化し、吸収し、利用し、最終的に排泄するかという、受け取る側の事情を考慮することが極めて大切である。消化・吸収・栄養素の運搬・分配は複雑な過程を経てなされるため、全体を最適化しつつ各所で問題が起こらないように調節していくことが大切である。また、不要になったものを速やかに排泄することも、次に必要となる栄養素を得たり、不要になった物の害を排除したりするために重要である。

食餌を摂取した後、栄養素を体内へ持ち込むのが消化管の役目である。消化管は、先端の口腔から食道、胃、十二指腸、小腸、大腸を経て肛門に至るまで、各部分で大きく異なった機能を持ち合わせている。加えて、

それぞれに物理化学的および生物・微生物学的に固有の環境を伴っている。消化管各部位それぞれの機能と環境は密接に関連付いていて、消化管において摂取した食餌をどのように消化・吸収し、利用・排泄するかを理解するためには、この点を深く理解することが不可欠である。

大腸は消化管の中でもっとも共生微生物が多い部位である。その意味で、他の部位と比べ特異な環境にあり、その影響を受けているであろうと考えられている。このような視点から研究の先鞭を付けたのが Elie Metchnikoff である。彼は、大腸に備わる免疫機能を介した大腸内腐敗の寿命への負の影響の研究¹⁾を進めた。その研究の中で、発酵乳を多く摂取するコーカサス地方の人に長寿者が多いことから、発酵乳が大腸での腐敗を抑え健康長寿に貢献するという仮説を提唱した。「発酵乳の不老長寿説」呼ばれるもので、腸内腐敗が早老早死の原因で、発酵乳を食べることで腸内腐敗を抑制できるというものである。これは現在進められている機能性食品、特に「お腹の調子を整える」ことを基本としたプロバイオティクスやプレバイオティクス、さらにはバイオジェニクスへと繋がっている。それ以降約 100 年の間、脈々と研究が続けられ多くの科学的知見が積み上げられ今日に至っている。

腸内細菌叢とは腸内に生息する細菌集団のことである。ヒト大腸内は消化管の中で最も共生微生物が多く大腸内容物 1g 当たり 10^{11} 個もの細菌が生息しており、腸管全体で 100 兆個に達する。菌の種類は 100~300 種類と考えられる。健康な成人では、正常細菌叢と呼ばれる安定した細菌叢が形成され、嫌気性菌が 99% を占める。Metchnikoff 以降、この腸内細菌叢と腸管を介した健康への影響を探る研究が多数なされており、腸内細菌叢が生体にとって有益にも有害にも働くことはよく知られることとなっている。腸内細菌叢と生体との関係は、腸内細菌叢の構成と菌の代謝の面から考える必要がある。両者は極めて緊密な関係にあるが、前者は免疫賦活、外来病原菌の排除、日和見感染の抑制などに関係していると考えられる。後者は腸内腐敗、発ガン物質や毒素産生などの有害な面と、有機酸産生などの有益な面とが考えられる。この腸内細菌叢と健康影響の知見を Fig. 1-1 にまとめた。

Bifidobacterium は腸内有益菌の代表的存在である。1899 年に Tissier によって母乳で育てられている健康な乳児の糞便から発見された嫌気性腸内細菌である²⁾。*Bifidobacterium* 属は、Fig. 1-2 のようにヒト腸内で *Bacteroides* 属や *Clostridium* 属と並び多量に存在し、健康なヒトの糞便中で 1g 中 10^{10} 個程度検出され³⁾、

糖質を代謝して乳酸と酢酸を生成する。このため腸内の *Bifidobacterium* が優勢な場合は、大腸内の pH が下がり酸性環境となり、大腸菌群、*Clostridium* 属ウェルシュ菌などの増殖が抑えられ、良い腸内環境が維持される。

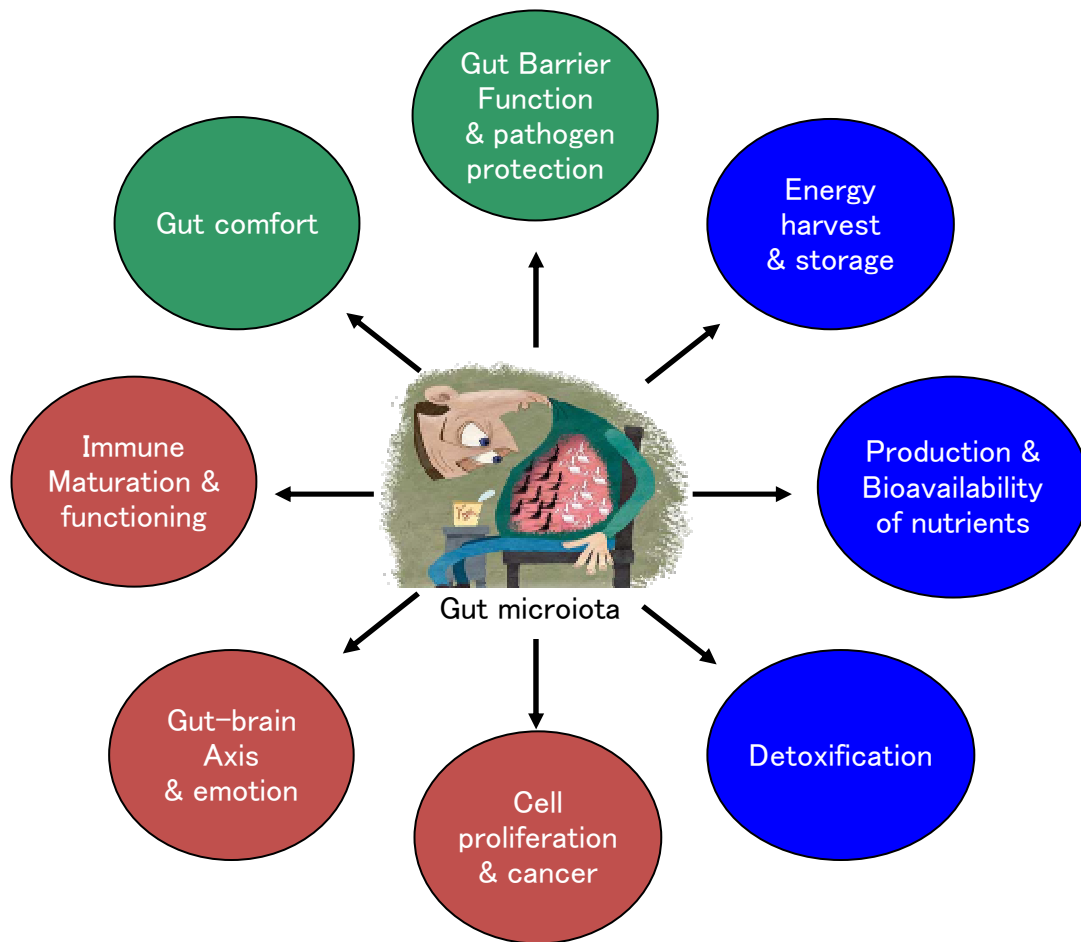
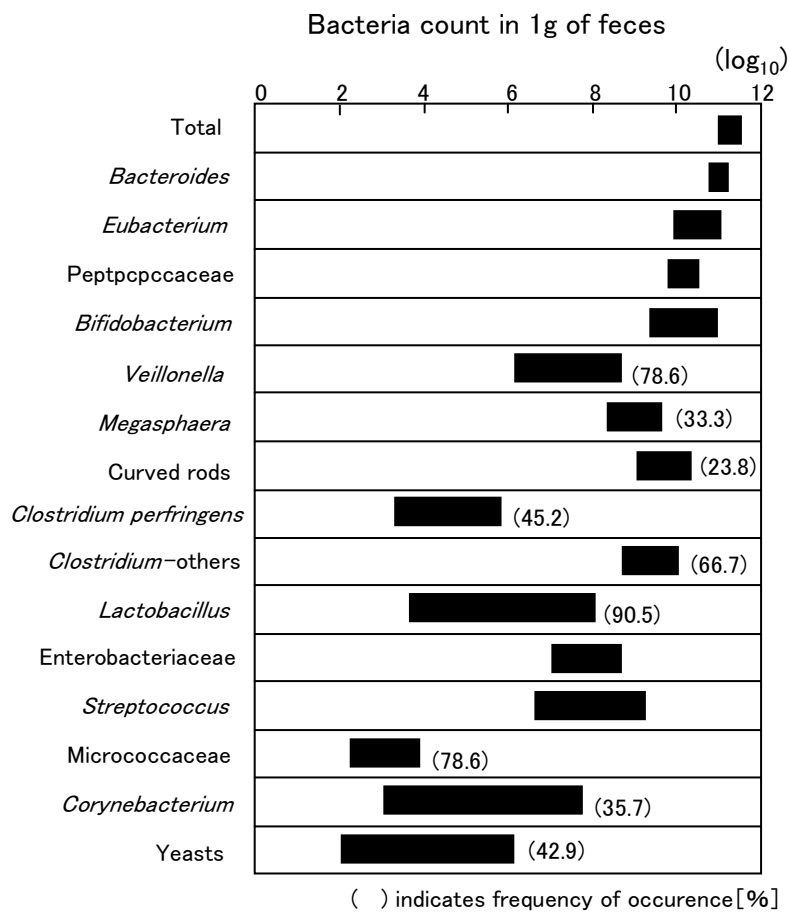


Fig. 1-1 Intestinal microbiota and the effect on health.



T. Mitsuoka et al : Zentralbl. Bakteri. Hyg. I. Org. A, 234, 219-233 (1976) has been modified.

Fig. 1-2 The composition of intestinal microbiota in human adults.

近年の機能性食品の中に、「プロバイオティクス」が含まれる。1989年のFullerによる定義⁴⁾では、プロバイオティクスは、「腸内細菌叢のバランスを改善することにより、宿主に有益な効果をもたらす生菌」とされた。その後、国際連合の食料農業機関および世界保健機関共同のプロバイオティクス評価ガイドライン作成ワーキンググループの報告書⁵⁾では「適正量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体」とより具体的に再定義された。このワーキンググループはプロバイオティクスの持つべき重要な活性として、①胃酸耐性、②胆汁酸耐性、③粘液、腸管細胞またはその両者に対する付着性、④病原菌に対する付着阻害性、⑤胆汁酸変換活性を持たないこと、⑥殺精子剤に対する耐性(膣用の場合)、などを挙げている。つまり⑥を除き、生きて腸に到達し、長くとどまり、有害菌を排除する作用に加え、生体機能に対する影響力と有用性が求められる。

プロバイオティクスを食品に添加することを意図したとき、ヨーグルトのような発酵乳は有力な例である。なぜならば製造に発酵工程があり生菌を増殖させることができ、また発酵基材となる乳はプロバイオティクスの多くが属する乳酸菌の増殖に好適な培地となるからである。また、おいしく日常的に摂取でき安価に入手することも可能である。

日本においてヨーグルトの健康への有効性はおなかの調子を整える、すなわち整腸効果として一般消費者にも広く知られているところであり、2011年の年間消費量で1,452,979klの市場を築く一因である。国民一人当たりのヨーグルト消費量は1990年には2.5kg/人/年、2000年には6.5kg/人/年、2011年には7.5kg/人/年と増加し⁶⁾、今では食生活において広く受け入れられている。プロバイオティクスを含むヨーグルトは、ヨーグルト製品群の中でも中核的な地位を占め、市販される品目、用いられるプロバイオティクスの属、種、株、その用途、用法、摂取量も多種多様である。この様にヨーグルトやプロバイオティクスは裾野広く市場と食生活に浸透し、実生活レベルで健康に貢献している。

ヨーグルトやプロバイオティクスの市場発展性を科学技術が支えているのは言うまでもない。ヨーグルトの成り立ちについては細野らにより詳しく記されている⁷⁾。ここではプロバイオティクスに焦点を当てる。

次に示すのは、プロバイオティクスの開発に必要な過程である。

一般消費者を対象とするプロバイオティクス製品の開発および消費の実態、将来への期待を示すと、概ね次のようになる。

選抜、培養技術確立、食品への工業的応用、量産化を図った上でまたは平行して、有効性とメカニズム研究、摂取量設定、ヒトにおける一般消費での有効性検証、安全性確認を経て実用化に至る。開発された製品は市販・消費され、生理効果を発揮することが期待され、消費者からのフィードバックは次の研究へとつながる。OMICS 研究手法にはこの分野への新たな研究成果をもたらす期待がある。

各工程を詳しく記すと次のようになる。選抜では、対象となりうる微生物のライブラリーからいくつかのキーとなる表現形をパラメーターとして優劣を評価し、適切な菌株を選抜する。

培養技術確立では、当該菌株の培養条件を検討する。この際、開発の対象が発酵食品であれば、対象となる食品基材を前提として培養条件を設定していく。副菌株との共培養系であればそれらとの組み合わせも検討する。その際、継代培養を経てもプロバイオティクスとしての活性、遺伝形質の変異のしやすさと安全性、発酵性能や増殖性、といった点が安定であることを確認する。

食品への工業的応用では、生産方法をデザインする。すなわち、使用する機器、1 バッチの規模、生産に要する時間といった要素から、食品安全性(特に発酵食品では、異菌種混入・増殖)、生産効率、経済性を評価した上で生産方法をデザインする。

有効性メカニズム研究では、*in vitro* や *in vivo* での評価系を用いることが多い。これまでなされたものは、*in vitro* では胃酸耐性、胆汁酸耐性、腸内細菌培養系での菌濃度増減および他菌への影響、腸上皮細胞およびムチン粘膜層への接着性、各種免疫細胞への関与、など多数ある。また *in vivo* では、腸内細菌叢への影響、短鎖脂肪酸(Short chained fatty acid: SCFA)生成量、腸管炎症、感染症抵抗性、アレルギーや癌などの免疫関連疾病への影響等、こちらも多数のモデルがある。

摂取量設定では、ヒトを用いる場合が多い。食品として実用化する際には、プロバイオティクスによる有効な面を期待するが、同時に副作用を抑えることを考慮する必要がある。従って、最低有効摂取量、摂取量依存性を明らかにし、実用に資する。

ヒトにおける一般消費での有効性検証では、プロバイオティクスを含む食品と含まない食品で有効性を比較する対照比較試験またはプロバイオティクス以外の共培養微生物のない単菌の食品での試験系で、プロバイオティクスそのものの有効性を明らかにする。実用に近い段階となるので当然ヒトを用いることになる。ヒ

トでの介入試験を実施する場合、多大な労力を要する。すなわち、被験者の人権および安全性を確保するための倫理性の検討、実施のための多額の費用、多数の被験者となるため診断や検体評価の体制作りなどに、十分な計画と資源投入が求められる。

安全性確認では、前述の最低有効摂取量、摂取量依存性で得られた知見を元に過剰量摂取や長期摂取試験などをヒトで行う。近年、既存の機能性食品の安全性が疑問視されるケースもあることから、重要な過程である。

市販され摂取されたプロバイオティクスを含む製品は、なんらかの有効性を発揮することが期待される。消費者から様々な情報提供を求められることもしばしばある。その際に、必要な情報を適切な形で提供することは極めて大切である。特に関心が高いのは、有効性、推奨摂取量、摂取方法(時間帯等)といったもので、これらの問いには前述のヒト介入試験の情報が重要な位置を占める。

飛躍的に多くの情報を提供することができる OMICS 研究手法が普及し、これまで分析手法の煩雑さが研究の量も質も制限していた状況を打破する期待がある。

現在すでに、日本の食品市場にいくつかのプロバイオティクス製品が存在し、一般消費者の日常的使用に提供されている。しかし、プロバイオティクスまたはそれを用いた製品の有効性、作用機序が十分に解明され、消費者が満足する程の情報が提供されているとは言えない。制限要因となっているのは、ヒトにおけるデータが極めて限定的であることである。ヒトを用いた試験は、非常に多くの作業量、費用、時間を要し、容易に実施できない。しかし、消費者が求める、どのプロバイオティクスが有効なのか、有効性を確かにするための付帯条件は何か(摂取量、摂取方法)、腸内細菌叢の変化(有益菌、有害菌の増減)、生きて腸に届くかどうか、といった情報は、ヒトでのデータが必須である。

本研究では、このようなニーズのもと消費者のより良い食生活への貢献を志し、プロバイオティクスを摂取した際に消費者が実生活の中で経験する整腸効果を科学的視点で解き明かすことに主眼を置いた。第2章および第3章に示した5回の介入試験では、全て日常の食生活を視野にヒトを用い、プロバイオティクスを含んだヨーグルト(以下プロバイオティクスヨーグルトと称し、必要に応じ Strain 名を付して示す)の摂取と腸内細菌叢中の *Bifidobacterium* 菌数および占有率の変化を観察することを軸に、整腸効果とプロバイオティクス

の関与について検討した。

本研究には3種の菌株 *Bifidobacterium lactis* BB-12(以下BB-12)、種が同じである *Bifidobacterium lactis* DN173010(以下DN173010)および属が異なる *Lactobacillus paracasei* KW3110(以下KW3110)を用いた。複数の株を用いた理由は、異なるプロバイオティクスの有効性を比較評価する必要があったからである。日本の市場には多数のプロバイオティクスヨーグルトがあり、消費者は自由に選択できる。しかし、選択のために必要な情報は十分に提供されておらず、その情報を支えるデータも十分でない。ニーズとシーズを適切にマッチさせるために、この複数株の比較検討が必要であると考えた。

また、プロバイオティクスそのものの有効性を評価する際には、無作為化比較試験(Randomized Controlled Trial: RCT)を採用した。ヒトにおいて介入試験を実施する場合、十分な客観性を確保しかつ有効成分の効果を明確に判定する必要があり、試験方法がRCTであるかどうかはその信頼性の上で重要である。摂取量も過剰量から極少量まで幅広くまた通常摂取量とその付近では摂取量依存性も含めてプロバイオティクスの影響評価が出来る設定とした。

整腸効果を示す指標を、便性、腸管通過時間、腸内細菌叢、腸内環境とした。便性として、排便頻度、排便量、便の色、形状および排便時の感覚を調べ、日常生活で分かりやすい排便関係の指標に重きを置いた。腸内細菌叢として、有益菌とされる *Bifidobacterium* 菌数とその総菌数に対する比率(占有率)を中心に主要な腸内細菌を調べた。腸内環境として、糞便の水分、pH、アンモニア量、乳酸量、SCFA量を調べた。

排便に関する問題は高頻度で起こる問題である。調査方法にもよるが60-70%またはそれ以上の人が排便に問題を抱えているとも言われる。プロバイオティクスが排便を整えることを示す事例はあるが、専ら排便頻度や排便量を中心に評価されて来た。本研究では、これら2指標に加え食物の腸管通過時間を加え、消化管内容物がどのようにスムーズに腸管を通過していくか、それがどのように排便頻度や排便量という自覚しやすい指標に結びつくかを解明することを試みた。さらにバイオジェニクスとして先に開発されたKW3110についてバイオジェニクスとプロバイオティクス両概念に接点があるという期待から、プロバイオティクス活性の検証を行った。

第Ⅱ章第1節に示す、「*Bifidobacterium lactis* BB-12の整腸効果と摂取量依存性および過剰量摂取時の

安全性」において、世界的に広く利用されている *Bifidobacterium lactis* BB-12 を含有したヨーグルトを用いて、当株の腸内細菌叢の変化や便性改善を含めた整腸効果への有効性、摂取量依存性、さらに過剰量摂取時の安全性を評価した。

第Ⅱ章第2節に示す、「*Bifidobacterium lactis* DN173010 のヨーグルト摂取ヒト無作為化比較試験での腸管通過時間を中心とした整腸効果の評価」において、世界的に摂取されている *Bifidobacterium lactis* DN173010 の有効性を評価するため、DN173010 非含有ヨーグルトを対照ヨーグルト(Control yogurt)とし、無作為化二重盲検対照比較クロスオーバー法により、健常女性を対象にて、腸内細菌叢の変化と便性改善およびそれをより深く検討するため腸管通過時間などを観察した。

第Ⅲ章に示す、「*Lactobacillus paracasei* KW3110 のプロバイオティクス活性と整腸効果の評価」において、新規開発の *Lactobacillus paracasei* KW3110 のプロバイオティクスとしての活性確認を行った。

第Ⅱ章 *Bifidobacterium lactis* の整腸効果の評価

第1節 *Bifidobacterium lactis* BB-12 の整腸効果と摂取量依存性

および過剰量摂取時の安全性の評価

Ⅱ-1-1 緒言

ヨーグルトは、乳酸菌等の生体にとって有益な微生物を多く含んでおり、その摂取により整腸効果が得られ健康に貢献するということが広く知られるようになってきた。それと同時にさまざまな菌株についてその整腸効果への寄与が明らかになってきている⁸⁾。しかし、整腸効果発現については乳酸菌の菌種や菌株⁹⁾⁻¹⁶⁾によって、また摂取量¹²⁾によって違いがあると考えられている。

Bifidobacterium は広義での乳酸菌の一種であり、ヒト成人の腸内細菌叢において優勢なグループのうちの1つである。光岡らは、*Bifidobacterium* が腸内環境の改善に非常に深く関係することを報告した¹⁷⁾。その後、整腸効果^{10), 18)}、免疫賦活効果^{19), 20)}、抗腫瘍効果^{19), 20)}、感染症予防効果²¹⁾など様々な生理学的機能が報告されている。このように腸内細菌叢における *Bifidobacterium* がヒトの健康に大きく関係していることが知られるようになり、注目を集めている。

このような腸内細菌叢研究の成果の一つに、プロバイオティクスの発見・普及があげられる。プロバイオティクスは、「適正量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体」と定義されている⁵⁾。*Bifidobacterium lactis* BB-12 はプロバイオティクスとしてヨーグルト等の食品への応用が進められている菌株である。

本節では、BB-12 の整腸効果を検証するため、日常的摂取レベルを想定し、以下に示すヒト試験を実施した。

(1)BB-12 有効性試験： ヒト介入試験において、客観性を高めるためには無作為化比較試験(Randomized Controlled Trial: RCT)とすることが求められる。過去に報告されたBB-12 を用いたヨーグルトでのヒト試験¹¹⁾を調査し、試験で摂取したヨーグルトに含まれる生菌の中で、最も整腸効果を発揮しているのはプロバイオティクスとして確立しているBB-12であると推定した。しかしこの試験はRCTではなかったため有効性がBB-12によるものかは明確に結論付けられない。そこでBB-12 そのものの影響を評価するために、BB-12ヨーグル

トに対し BB-12 を添加しないヨーグルトを対照とし、日本人健常成人女性を対象とした無作為化一重盲検対照比較クロスオーバー試験(RCT)を行った。摂取量は消費市場統計により最も標準的摂取量と考えられた 100g/日とした。

(2)BB-12 摂取量依存性試験：有効成分や食品の摂取推奨量を設定する上で、摂取量依存性の有無および最低有効摂取量を把握することは重要である。一般的な 1 日当たりのヨーグルト摂取量の範囲で多めと考えられる 150g と少なめと考えられる 80g の 2 点を設定した。

(3)BB-12 過剰量摂取試験：安全かつ安心な一般消費を支える上で、過剰量摂取した場合でも大きな副作用がないことを確認するのは大切であるが、食品において明確な過剰量の定義はない。一般的には、摂取量の 3 倍から 5 倍で過剰量摂取試験を行う場合が多い。これに従い、本研究の過剰量摂取試験は、一般的な 1 日当たりのヨーグルト摂取量で多めと考えられる 150g の 3 倍の、1 日当たり 450g の摂取で行った。

II-1-2 材料と方法

II-1-2-1 試験食品

プロバイオティクスヨーグルトとして加熱殺菌済み生乳に BB-12、*Lactobacillus acidophilus* A(小岩井乳業(株)保有株)、*Streptococcus thermophilus* G(小岩井乳業(株)保有株)、および *Lactococcus lactis* H 株(=Chr. HANSEN 社 HB3) を接種し、38℃で 17 時間発酵させて調製した(以下、BB-12 ヨーグルトとする)。対照ヨーグルト(Control yogurt)は、BB-12 を接種しないで調製したこと以外は BB-12 ヨーグルトと同様のものを用いた。ヨーグルトの最終 pH は 4.25~4.65 とした。調製したヨーグルトの成分組成を Table 2-1-1 に示した。

Table 2-1-1 Composition of BB-12 yogurt and control yogurt (100g).

	Control yogurt	BB-12 yogurt
Energy	65 kcal	65 kcal
Protein	3.2 g	3.2 g
Lipids	3.8 g	3.8 g
Carbohydrates	4.6 g	4.6 g
Na	46 mg	46 mg
Ca	110 mg	110 mg
<i>L. acidophilus</i> A	5.0×10^9 cfu *	5.0×10^9 cfu
<i>S. thermophilus</i> G	1.5×10^{10} cfu	1.5×10^{10} cfu
<i>Lc. lactis</i> H	1.0×10^9 cfu	1.0×10^9 cfu
BB-12	0 cfu	4.0×10^9 cfu

*cfu: Colony forming unit

II-1-2-2 被験者

BB-12 有効性試験は、昭和女子大学に在籍する健常成人女性 35 名(20~39 歳、平均年齢 22.2 歳)を対象として行った。BB-12 摂取量依存性試験は、健常成人男女 16 名(男性 13 名、女性 3 名、平均年齢 39.8 歳、27 歳~55 歳)を対象として行った。BB-12 過剰量摂取試験は、健常成人男女 10 名(男性 4 名、女性 6 名、平均年齢 39.9 歳、32 歳~53 歳)を対象として行った。

各試験において、期間中被験者に対して本試験で提供されるヨーグルト以外のヨーグルトや乳酸菌飲料および納豆を摂取しないよう、さらにオリゴ糖、食物繊維、その他腸内細菌叢に影響を及ぼす食品を積極的に摂取しないよう指示した。また、便秘薬、下痢薬、整腸剤、制酸剤、その他腸内細菌叢および糞便の性状に影響を及ぼす薬物を常用しないよう指示した。それ以外の食事については特に指示しなかった。なお、本試験はヘルシンキ宣言の精神に従い、キリンビール株式会社および昭和女子大学の倫理委員会の承認を得た。被験者には試験内容を十分に説明し、試験実施前に書面による同意を得て実施した。

II-1-2-3 試験デザイン

II-1-2-3-1 BB-12 有効性試験

試験スケジュールを Fig. 2-1-1 に示した。BB-12 ヨーグルトと対照ヨーグルトを用いた無作為化一重盲検対照比較クロスオーバー試験を実施した。試験開始前に日常の 1 週間あたりの排便頻度をアンケートにて調査し、被験者を無作為に 2 群(A 群および B 群)に分け、群間で排便頻度に偏りが無いことを確認した。はじめに事前観察期(14 日間)として非摂取期間を設定した。次に摂取第 1 期(14 日間)として A 群は BB-12 ヨーグルト、B 群は対照ヨーグルトを摂取した。休止期(21 日間)として A 群 B 群ともに非摂取期間を設定した。最後に摂取第 2 期(14 日間)として A 群は対照ヨーグルト、B 群は BB-12 ヨーグルトを摂取した。摂取期には BB-12 ヨーグルトまたは対照ヨーグルトを毎日 100g ずつ、任意の時間に摂取した。なお、試験食品が BB-12 ヨーグルトであるか対照ヨーグルトであるかは被験者に告知しなかった。

糞便試料の採取は、事前観察期の 5 日目~7 日目(中間)と 12~14 日目(終了時)、摂取第 1 期の 5 日目~7 日目(中間)と 12~14 日目(終了時)、摂取第 2 期の 5 日目~7 日目(中間)と 12~14 日目(終了時)の

計 6 回とした。

II-1-2-3-2 BB-12 摂取量依存性試験

試験スケジュールを Fig. 2-1-2 に示した。被験者を 8 名ずつ 2 群に分け、それぞれ BB-12 ヨーグルトを 1 日あたり 80g 摂取する 80g 群、および 150g 摂取する 150g 群とした。はじめに事前観察期(14 日間)として非摂取期間を設定した。次に摂取期(14 日間)として各群所定量の BB-12 ヨーグルトを摂取した。BB-12 ヨーグルトは任意の時間に摂取することとし摂取の方法は特に指定しなかった。最後に事後観察期(14 日間)として非摂取期間を設定した。試験中、80g 群で脱落者が 1 名発生したため、解析に用いたのは 80g 群で 7 名、150g 群で 8 名であった。糞便試料の採取は、事前観察期の 12~14 日(終了時)、摂取期の 12~14 日目(終了時)、および事後観察期の 12~14 日目(終了時)の計 3 回とした。

II-1-2-3-3 BB-12 過剰量摂取試験

試験スケジュールを Fig. 2-1-3 に示した。はじめに事前観察期(7 日間)として非摂取期間を設定した。次に摂取期(14 日間)として 1 日あたり 450g の BB-12 ヨーグルトを摂取した。BB-12 ヨーグルトは任意の時間に摂取することとし摂取の方法は特に指定しなかった。最後に事後観察期(7 日間)として非摂取期間を設定した。

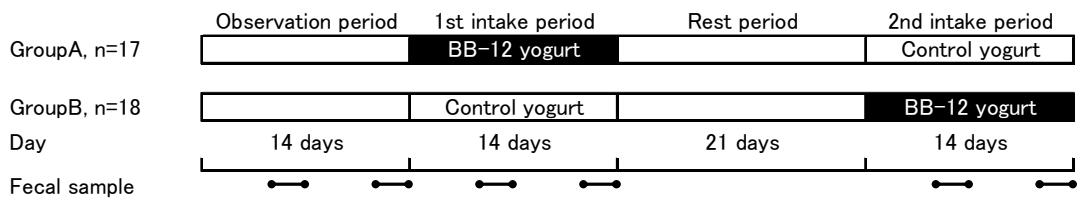


Fig. 2-1-1 Schedule of BB-12 efficacy study.
 Fecal samples were collected once in 3 days indicated by the bars which are 5th day-7th day (the middle of the period) and 12th day - 14th day (the end of the period) of observation period, 1st intake period and 2nd intake period.

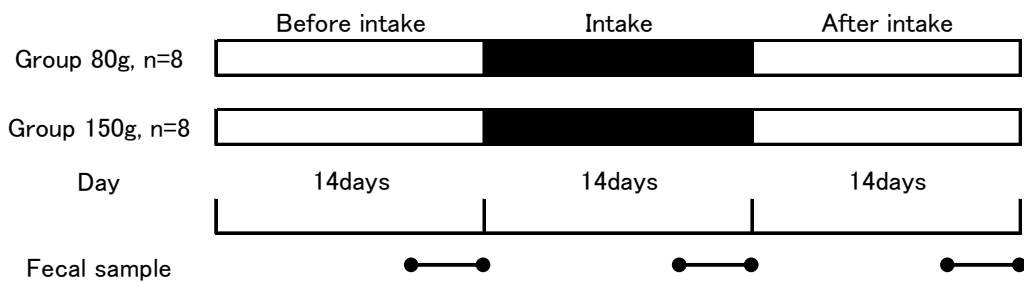


Fig. 2-1-2 Schedule of BB-12 dose dependency study.
 Fecal samples were collected once in 3 days indicated by the bars, which were 12th day - 14th day of before intake period, intake period and after intake period.

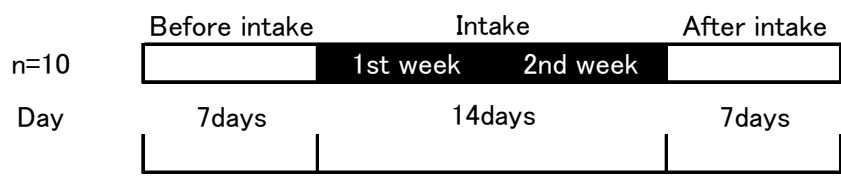


Fig. 2-1-3 Schedule of BB-12 overdose study.

II-1-2-4 試験中の生活および便性の調査

各試験において、被験者に毎日日誌の記入を依頼し、便性(排便状況、糞便性状)、食事内容、制限食品および薬物の摂取、生活習慣、体調およびヨーグルトの摂取状況を記録した。排便状況では、排便頻度(排便回数、排便日数)、排便毎の排便量、爽快感を記録した。また、糞便性状では排便毎の便の形状および色を記録した。排便量は、直径 20mm、長さ 100mm の円柱棒の本数に換算した。爽快感は、1:ない、2:あまりない、3:ややある、4:ある、とし点数を記録した。形状は、1:泥状、2:半練状、3:バナナ状、4:カチカチ状、5:コロコロ状、とし点数を記録した²³⁾。色は JIS Z8721 準拠 JIS 標準色票光沢版から、1:5Y8/12 (黄色)、2:2.5Y7/12(薄い黄土色)、3:10YR5/8(黄土色)、4:7.5YR4/6(茶色)、5:5Y4/4(こげ茶色)、6:2.5GY4/3(黒に近いこげ茶色)、の標準色を被験者に配付し最も近い色を点数で記録した¹⁰⁾。食品を摂取してから便として排出されるまでの時間は、人種にもよるが通常 36~72 時間程度とされている²⁴⁾。また、便秘の場合は 3 日から数日に 1 回の排便であることが多い¹¹⁾。そこで、BB-12 有効性試験および BB-12 摂取量依存性試験では、14 日間の事前観察期と摂取期のうち後半の 11 日間を排便状況と糞便性状の解析対象期間とした。BB-12 過剰量摂取試験においては、事前観察期および事後観察期は 7 日間すべてを、摂取期は 14 日間を第 1 週および第 2 週に分け各週毎に 7 日間すべてを、解析対象とした。排便回数、排便日数、排便量は、解析対象期間の総和を、爽快感、形状、色は、解析対象期間の排便毎の平均値を算出した²²⁾。

更に BB-12 過剰量摂取試験では、随伴症状を調査した。BB-12 ヨーグルト摂取開始時と摂取終了時に、消化器症状(悪心、嘔吐、吐き気、腹痛、下痢、腹部不快感、便秘)、神経系症状(めまい、ふらつき、立ちくらみ、頭痛、頭重)、過敏症(発熱、発汗、顔面潮紅、咽頭の症状)、皮膚症状(発疹、発赤、かゆみ)を記録した。

II-1-2-5 腸内細菌叢の検索

BB-12 有効性試験と BB-12 摂取量依存性試験では腸内細菌叢の検索を行った。BB-12 有効性試験においては、被験者 35 名のうち同意の得られた 26 名から、事前観察期の中間と終了時、摂取第 1 期の中間と終了時、摂取第 2 期の中間と終了時の計 6 回、糞便を採取した。BB-12 摂取量依存性試験では、事前観察

期、摂取期および事後観察期の終了時に被験者全員から糞便を採取した。糞便 1 回分の全量をポリ袋に採取し、脱酸素剤(アネロパックケンキ、三菱ガス化学株)とともに酸素非透過性の容器に入れ、保冷剤にて低温に維持した。光岡ら²⁵⁾の方法に準じて腸内細菌叢を検索した。すなわち、糞便を均質化した後、0.09%寒天を添加した滅菌生理食塩水に懸濁、段階希釈し、平板培地に塗布し、各細菌数を測定した。検索対象とする細菌は、非選択培地として嫌気性菌には EG 寒天培地および BL 寒天培地を、好気性菌には TS 寒天培地を、*Bifidobacterium* 選択培地として BS 寒天培地を、*Lactobacillus* 選択培地として LBS 寒天培地を、*Clostridium lecithinase*(+) 選択培地として CW 寒天培地を、*Clostridium lecithinase*(-) 選択培地として Clostridia 寒天培地を、Bacteroidaceae 選択培地としてバクテロイデス寒天培地を、*Eubacterium* 選択培地として ES 寒天培地を、*Streptococcus* 選択培地として TATAC 寒天培地を、Enterobacteriaceae 選択培地として DHL 寒天培地を用いた。総菌数は嫌気性菌と好気性菌の合計とした。菌数は糞便 1g あたりの常用対数(log cfu/g)で示した。各菌の占有率は総菌数に対する比率とした。出現率は被験者の内当該菌を検出した比率とした。

II-1-2-6 糞便中の水分、アンモニア量、pH の測定

BB-12 有効性試験と BB-12 摂取量依存性試験では、糞便中の水分、アンモニア量、pH の測定を行った。水分は、糞便 1g を -80°C で 24h 以上凍結させた後、真空定温乾燥機(DP シリーズ、ヤマト科学株)にて 48 時間真空乾燥させ、乾燥前後の重量差より算出した。アンモニア量は、糞便 1g を 2%過塩素酸にて懸濁し、遠心分離した後、上清を糞便重量に対し 2%過塩素酸で 1000 倍希釈したものを試料とし、アンモニア測定キット(アンモニア テストワコー、和光純薬工業株)を用いて測定した。pH は、pH メーター(Twin、堀場製作所株)の電極を直接糞便に接触させて測定した。それに加え BB-12 有効性試験では、糞便中の乳酸および SCFA 量を測定した。糞便を 2%過塩素酸にて懸濁し、遠心分離した後、上清を 0.45 μm のクロマトディスクでろ過し試料とし、有機酸分析セット Shodex OA(昭和電工株)にて、乳酸と、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、酪酸、イソ吉草酸および吉草酸の 7 種の SCFA 量を測定した。

II-1-2-7 統計処理方法

排便回数、排便日数、排便量、爽快感、形状、色、腸内細菌数、腸内細菌占有率、糞便の水分、アンモニア量、pH の期毎の比較は、対応のある Wilcoxon signed-rank test (ウィルコクソン符号付順位和検定) を用いて行った。腸内細菌の出現率は χ^2 検定を用いて行った。危険率 (ρ) が 0.05 未満の場合を有意差があると判断し、0.05 以上 0.1 未満の場合を差がある傾向があるとした。統計ソフトは、SPSS 11.0 J を用いた。

II-1-3 結果

II-1-3-1 被験者

II-1-3-1-1 BB-12 有効性試験

試験期間中、一時的に下痢気味となった所見が観察されたが、水分の取り過ぎによること、および一過性であったことから、試験継続には問題ないと判断した。その他、本試験中に試験食品が原因と考えられる体調不良等の異常所見は観察されなかったことから、試験食品摂取で健康を損なうことは無いと判断した。

試験の協力者 35 名のうち、ヨーグルト摂取忘れ(4 名)、アンケート記入漏れ(2 名)を理由に 6 名の被験者を除外し、29 名(20~39 歳、平均年齢 22.0 歳)を解析対象とした。うち、糞便調査に同意したものは 20 名であった。

被験者全体の解析に加えて、事前観察期の排便回数が 4 回/週以下の便秘傾向者群と 5 回/週以上の非便秘傾向者群に分け、解析した。被験者 29 名のうち便秘傾向者群は 13 名(うち糞便調査該当者は 9 名)、非便秘傾向者群は 16 名(うち糞便調査該当者は 11 名)であった。

II-1-3-1-2 BB-12 摂取量依存性試験

BB-12 摂取量依存性試験に協力した 16 名のうち、80g 群に属する 1 名が風邪のため長期にわたり下痢症状が見られ制限した薬物の摂取もあったため除外し、残りの 15 名を解析対象とした。

II-1-3-1-3 BB-12 過剰量摂取試験

体調不良等の異常所見は観察されなかった。全員を解析対象とした。

II-1-3-2 便性(排便状況、糞便性状)

II-1-3-2-1 BB-12 有効性試験

排便状況の結果を Table 2-1-2 に示した。被験者全体における排便日数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)増加し、対照ヨーグルト摂取期でも事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。排便量は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に ($p < 0.01$)増加した。

便秘傾向者群では、排便回数は BB-12 ヨーグルト摂取期、対照ヨーグルト摂取期ともに事前観察期に比

べて有意に($p < 0.01$)増加した。排便日数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。また、BB-12 ヨーグルト摂取期、対照ヨーグルト摂取期ともに事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)増加した。

その他の項目では有意な差は見られなかった。

糞便性状の結果を Table 2-1-3 に示した。便秘傾向者群における形状は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意な($p < 0.05$)「カチカチ状」から「バナナ状」への変化が見られた。

その他の項目では有意な差は見られなかった。

II-1-3-2-2 BB-12 摂取量依存性試験

排便状況の結果を Table 2-1-4 に示した。150g 群において排便量は、摂取期で事後観察期に比べて有意に($p < 0.05$)高値を示した。その他の項目では有意な差は見られなかった。

糞便性状の結果を Table 2-1-5 に示した。150g 群において便の色は、摂取期で事後観察期に比べて有意な黄色への変化が見られた。その他の項目では有意な差は見られなかった。

II-1-3-2-3 BB-12 過剰量摂取試験

排便状況の結果を Table 2-1-6 に示した。排便回数は、摂取期 1 週目で事後観察期に比べて有意に($p < 0.05$)高値を示した。排便量は、摂取期 1 週目で事前観察期および事後観察期に比べて有意に($p < 0.05$)高値を示した。また摂取 2 週目で事前観察期に比べて多い傾向 ($p = 0.066$)を示した。

糞便性状の結果を Table 2-1-7 に示した。形状は、摂取期 1 週目および 2 週目で事後観察期に比べて有意な($p < 0.05$)変化を示した。色は、摂取期 1 週目で事前観察期に比べて黄色化する傾向 ($p = 0.074$)を示した。

Table 2-1-2 Effect of BB-12 yogurt on defecation in BB-12 efficacy study.

	All			n=29
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Defecation frequency (times/11 days)	6.9 ± 2.7 *	7.5 ± 2.6	8.3 ± 3.4	
Defecation frequency (days/11 days)	5.7 ± 2.0	6.6 ± 2.0 ^a	7.1 ± 2.3 ^b	
Quantity of feces (sticks/11 days)	23.2 ± 10.3	26.4 ± 10.9	29.1 ± 12.6 ^b	
Refreshing feeling (points)	3.1 ± 0.5	3.0 ± 0.5	3.0 ± 0.5	
Constipated subjects				n=13
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Defecation frequency (times/11 days)	4.7 ± 1.4	6.9 ± 2.6 ^b	8.3 ± 3.5 ^b	
Defecation frequency (days/11 days)	4.3 ± 1.4	6.3 ± 1.9 ^b	7.5 ± 2.3 ^{bc}	
Quantity of feces (sticks/11 days)	22.3 ± 8.2	28.9 ± 11.5 ^a	33.8 ± 10.3 ^b	
Refreshing feeling (points)	3.3 ± 0.5	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.3	
Not constipated subjects				n=16
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Defecation frequency (times/11 days)	8.6 ± 2.2	8.0 ± 2.6	8.3 ± 3.3	
Defecation frequency (days/11 days)	6.8 ± 1.8	8.0 ± 2.6	6.8 ± 2.4	
Quantity of feces (sticks/11 days)	23.9 ± 12.0	24.4 ± 10.3	25.2 ± 13.3	
Refreshing feeling (points)	2.9 ± 0.4	2.8 ± 0.6	2.8 ± 0.4	

* Mean ± SD.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).

b: Significantly different from before intake ($p < 0.01$).

c: Significantly different from control period ($p < 0.05$).

Table 2-1-3 Effect of BB-12 yogurt on fecal characteristics in BB-12 efficacy study.

	All			n=29
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Shape (points)	4.3 ± 0.7 *	4.2 ± 0.5	4.1 ± 0.6	
Color (points)	3.6 ± 0.7	3.6 ± 0.7	3.5 ± 0.7	
Constipated subjects				n=13
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Shape (points)	4.4 ± 0.6	4.2 ± 0.5	3.9 ± 0.6 ^a	
Color (points)	3.6 ± 0.7	3.5 ± 0.6	3.5 ± 0.7	
Not constipated subjects				n=16
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Shape (points)	4.3 ± 0.8	4.2 ± 0.5	4.3 ± 0.6	
Color (points)	3.6 ± 0.8	3.6 ± 0.8	3.6 ± 0.7	

* Mean ± SD.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).

Table 2-1-4 Effect of BB-12 yogurt on defecation in BB-12 dose dependency study.

		Group 80g				n=7	
		Before intake		Intake		After intake	
Defecation frequency (times/11 days)		13.6 ±	4.7 *	14.3 ±	5.2	12.1 ±	6.9
Defecation frequency (days/11 days)		9.4 ±	2.2	9.8 ±	1.8	8.3 ±	3.6
Quantity of feces (sticks/11 days)		32.1 ±	19.1	33.7 ±	22.1	28.6 ±	10.2
Refreshing feeling (points)		1.5 ±	0.5	1.5 ±	0.5	1.5 ±	0.5
		Group 150g				n=8	
		Before intake		Intake		After intake	
Defecation frequency (times/11 days)		13.0 ±	5.7	13.1 ±	3.2	12.9 ±	3.9
Defecation frequency (days/11 days)		9.4 ±	2.2	9.9 ±	1.1	9.8 ±	1.8
Quantity of feces (sticks/11 days)		30.5 ±	11.4	37.4 ±	13.7 ^a	30.5 ±	13.1
Refreshing feeling (points)		1.8 ±	0.5	1.6 ±	0.5	1.7 ±	0.3

* Mean ± SD.

a: Significantly different from after intake ($p < 0.05$).

Table 2-1-5 Effect of BB-12 yogurt on fecal characteristics in BB-12 dose dependency study.

		Group 80g				n=7	
		Before intake		Intake		After intake	
Shape (points)		2.4 ±	0.4 *	2.3 ±	0.4	2.4 ±	0.3
Color (points)		3.9 ±	1.0	3.6 ±	1.0	3.9 ±	1.0
		Group 150g				n=8	
		Before intake		Intake		After intake	
Shape (points)		2.5 ±	0.6	2.3 ±	0.5	2.2 ±	0.5
Color (points)		3.5 ±	0.7	3.0 ±	0.6 ^a	3.6 ±	0.5

* Mean ± SD.

a: Significantly different from after intake ($p < 0.05$).

Table 2-1-6 Effect of BB-12 yogurt on defecation in BB-12 overdose study.

	n=10			
	Before intake	Intake 1st week	Intake 2nd week	After intake
Defecation frequency (times/7days)	6.1 ± 4.5 *	7.4 ± 4.1 ^b	6.8 ± 3.7	5.3 ± 2.9
Defecation frequency (days/7days)	5.0 ± 2.0	5.1 ± 2.1	5.3 ± 2.3	4.7 ± 2.0
Quantity of feces (sticks/7days)	14.5 ± 11.1	20.3 ± 12.7 ^{ab}	17.5 ± 12.3	16.4 ± 14.0
Refreshing feeling (points)	3.0 ± 0.8	3.2 ± 0.7	3.1 ± 0.8	3.2 ± 0.7

* Mean ± SD.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).

b: Significantly different from after intake ($p < 0.05$).

Table 2-1-7 Effect of BB-12 yogurt on fecal characteristics in BB-12 overdose study.

	n=10			
	Before intake	Intake 1st week	Intake 2nd week	After intake
Shape (points)	3.5 ± 1.1 *	3.5 ± 0.9 ^b	3.7 ± 0.6 ^b	4.1 ± 0.6
Color (points)	3.7 ± 0.7	3.4 ± 0.7	3.3 ± 0.8	3.6 ± 0.9

* Mean ± SD.

b: Significantly different from after intake ($p < 0.05$).

II-1-3-3 腸内細菌叢

II-1-3-3-1 BB-12 有効性試験

事前観察期、BB-12 ヨーグルト摂取期および対照ヨーグルト摂取期の中間と終了時の 2 回の分析値を平均し各期のデータとした。腸内細菌叢の結果を Table 2-1-8 に示した。

被験者全体における Bacteroidaceae 菌数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期に比べて有意に($p < 0.05$)減少した。*Bifidobacterium* 菌数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比べて有意に($p < 0.01$)増加した。また、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)増加した。*Lactobacillus* 菌数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)増加した。

便秘傾向者群における総好気性菌数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)減少した。*Bifidobacterium* 菌数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比べて有意に($p < 0.05$)増加した。

非便秘傾向者群における *Bifidobacterium* 菌数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比べて有意に($p < 0.05$)増加した。また、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。*Clostridium* lecithinase(-) 菌数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)減少した。*Lactobacillus* 菌数は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。

その他の項目では有意な差は見られなかった。

各菌の出現率には、有意な差は見られなかった。

腸内細菌の占有率の結果を Fig.2-1-4 に示した。被験者全体における Bacteroidaceae 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期に比べて有意に($p < 0.05$)低下した。また、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)低下した。*Bifidobacterium* 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比べて有意に($p < 0.01$)上昇した。また、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)上昇した。

便秘傾向者群における Bacteroidaceae 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期に比べて有意に($p < 0.05$)低下した。*Bifidobacterium* 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取

期と比べて有意に($p < 0.01$)上昇した。また、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)上昇した。

非便秘傾向者群における Bacteroidaceae 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)低下した。*Bifidobacterium* 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比べて有意に($p < 0.05$)上昇した。また、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)上昇した。*Clostridium lecithinase*(-) 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)低下した。

Fig.2-1-4 には示さなかったが、被験者全体における *Lactobacillus* 占有率は、事前観察期の 0.001% に比べて BB-12 ヨーグルト摂取期の 0.025% となり有意に($p < 0.05$)上昇した。また、便秘傾向者群における総好気性菌占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期の 0.32% で事前観察期の 1.0% に比べて有意に($p < 0.05$)低下した。Enterobacteriaceae 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期の 0.13% で対照ヨーグルト摂取期の 0.25% に比べて有意に($p < 0.05$)低下した。また、非便秘傾向者群における *Lactobacillus* 占有率は、BB-12 ヨーグルト摂取期の 0.01% で事前観察期の 0.001% に比べて有意に($p < 0.05$)上昇した。

その他の項目では、有意な差は見られなかった。

II-1-3-3-2 BB-12 摂取量依存性試験

腸内細菌叢検索の結果を Table 2-1-9 に示した。80g 群において *Bifidobacterium* 菌数は、摂取期で事前観察期および事後観察期と比べて有意に($p < 0.05$)高値を示した。150g 群において *Bifidobacterium* 菌数は、摂取期で事前観察期と比べて有意に($p < 0.05$)高値を示した。*Clostridium lecithinase*(+) 菌数は、摂取期で事前観察期と比べて有意に($p < 0.05$)低値を示した。*Streptococcus* 菌数は、摂取期で事後観察期と比べて有意に($p < 0.05$)低値を示した。その他の項目では有意な差は見られなかった。

各菌の出現率には、有意な差は見られなかった。

腸内細菌占有率を Fig.2-1-5 に示した。80g 群において *Bifidobacterium* 占有率は、摂取期で事前観察期および事後観察期と比べて有意に($p < 0.05$)高値を示した。150g 群において Bacteroidaceae 占有率は、摂取期で事後観察期に比べて有意に($p < 0.05$)高値を示した。*Bifidobacterium* 占有率は、摂取期で事前観察期

と比べて有意に($p < 0.05$)高値を示した。また、Fig.2-1-5 には示さなかったが、150g 群における *Clostridium* lecithinase (+) 占有率は、摂取期の 0.0000005% で事前観察期の 0.00013% に比べて有意に($p < 0.05$)低値を示した。*Streptococcus* 占有率は、摂取期の 0.013% で事後観察期の 0.25% に比べて有意に($p < 0.05$)低値を示した。

個人別の *Bifidobacterium* 占有率を Fig2-1-6 に示した。80 g 群において、7 例中 6 例において摂取期で事前観察期に比べて *Bifidobacterium* 占有率が上昇した。150 g 群において、8 例中 8 例において摂取期で事前観察期に比べて *Bifidobacterium* 占有率が上昇した。

Table 2-1-8 Effect of BB-12 yogurt on the intestinal microbiota in BB-12 efficacy study.

	All			n=20
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Total	10.3 ± 0.3* (100%)**	10.4 ± 0.2 (100%)	10.4 ± 0.3 (100%)	
Total Anaerobes	10.3 ± 0.3 (100%)	10.4 ± 0.2 (100%)	10.4 ± 0.3 (100%)	
Total Aerobes	8.3 ± 0.4 (100%)	8.5 ± 0.7 (100%)	8.1 ± 0.2 (100%)	
Bacteroidaceae	9.8 ± 0.7 (100%)	9.8 ± 0.6 (100%)	9.6 ± 0.5 (100%) ^c	
<i>Bifidobacterium</i>	9.5 ± 0.5 (100%)	9.5 ± 0.5 (100%)	10.1 ± 0.3 (100%) ^{bd}	
<i>Eubacterium</i>	8.7 ± 1.0 (100%)	8.8 ± 1.0 (100%)	8.7 ± 0.8 (100%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(+)	4.8 ± 1.4 (50%)	5.8 ± 1.2 (50%)	4.4 ± 0.9 (65%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(-)	8.3 ± 0.4 (100%)	8.4 ± 0.7 (100%)	8.1 ± 0.5 (100%)	
<i>Lactobacillus</i>	5.3 ± 0.7 (100%)	6.2 ± 0.8 (95%)	6.8 ± 1.1 (100%) ^b	
<i>Streptococcus</i>	8.0 ± 0.3 (100%)	8.1 ± 0.5 (100%)	7.7 ± 0.9 (100%)	
Enterobacteriaceae	7.3 ± 0.6 (100%)	7.7 ± 0.8 (100%)	7.7 ± 1.0 (100%)	
Constipated subjects				n=9
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Total	10.3 ± 0.1 (100%)	10.4 ± 0.0 (100%)	10.5 ± 0.4 (100%)	
Total Anaerobes	10.3 ± 0.1 (100%)	10.4 ± 0.0 (100%)	10.5 ± 0.4 (100%)	
Total Aerobes	8.3 ± 0.4 (100%)	8.6 ± 0.8 (100%)	8.0 ± 0.2 (100%) ^a	
Bacteroidaceae	9.8 ± 0.8 (100%)	9.8 ± 0.6 (100%)	9.6 ± 0.7 (100%)	
<i>Bifidobacterium</i>	9.5 ± 0.5 (100%)	9.4 ± 0.3 (100%)	10.2 ± 0.4 (100%) ^c	
<i>Eubacterium</i>	8.9 ± 1.1 (100%)	8.9 ± 1.2 (100%)	8.6 ± 0.7 (100%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(+)	4.4 ± 0.8 (44%)	5.8 ± 1.2 (56%)	4.7 ± 1.0 (67%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(-)	8.0 ± 0.1 (100%)	8.0 ± 0.1 (100%)	8.1 ± 0.3 (100%)	
<i>Lactobacillus</i>	5.4 ± 0.8 (100%)	5.7 ± 0.8 (100%)	7.0 ± 0.2 (100%)	
<i>Streptococcus</i>	8.0 ± 0.2 (100%)	8.0 ± 0.4 (100%)	7.7 ± 0.9 (100%)	
Enterobacteriaceae	7.5 ± 0.8 (100%)	7.7 ± 0.7 (100%)	7.6 ± 1.0 (100%)	
Not constipated subjects				n=11
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Total	10.3 ± 0.1 (100%)	10.4 ± 0.3 (100%)	10.4 ± 0.2 (100%)	
Total Anaerobes	10.3 ± 0.1 (100%)	10.4 ± 0.3 (100%)	10.4 ± 0.2 (100%)	
Total Aerobes	8.3 ± 0.3 (100%)	8.4 ± 0.6 (100%)	8.1 ± 0.2 (100%)	
Bacteroidaceae	9.8 ± 0.5 (100%)	9.8 ± 0.7 (100%)	9.5 ± 0.4 (100%)	
<i>Bifidobacterium</i>	9.5 ± 0.5 (100%)	9.6 ± 0.6 (100%)	10.1 ± 0.2 (100%) ^{ac}	
<i>Eubacterium</i>	8.6 ± 0.7 (100%)	8.6 ± 0.7 (100%)	8.8 ± 0.9 (100%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(+)	5.0 ± 0.5 (55%)	5.7 ± 1.3 (45%)	3.9 ± 1.4 (64%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(-)	8.5 ± 0.5 (100%)	8.5 ± 0.8 (100%)	8.1 ± 0.6 (100%) ^a	
<i>Lactobacillus</i>	5.1 ± 0.3 (100%)	6.4 ± 0.9 (91%)	6.5 ± 0.8 (100%) ^a	
<i>Streptococcus</i>	8.1 ± 0.3 (100%)	8.2 ± 0.6 (100%)	7.7 ± 0.9 (100%)	
Enterobacteriaceae	7.1 ± 0.3 (100%)	7.7 ± 0.3 (100%)	7.7 ± 0.1 (100%)	

* Log₁₀ of bacteria count (cfu), mean ± SD.

**Frequency of occurrence.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).b: Significantly different from before intake ($p < 0.01$).c: Significantly different from control period ($p < 0.05$).d: Significantly different from control period ($p < 0.01$).

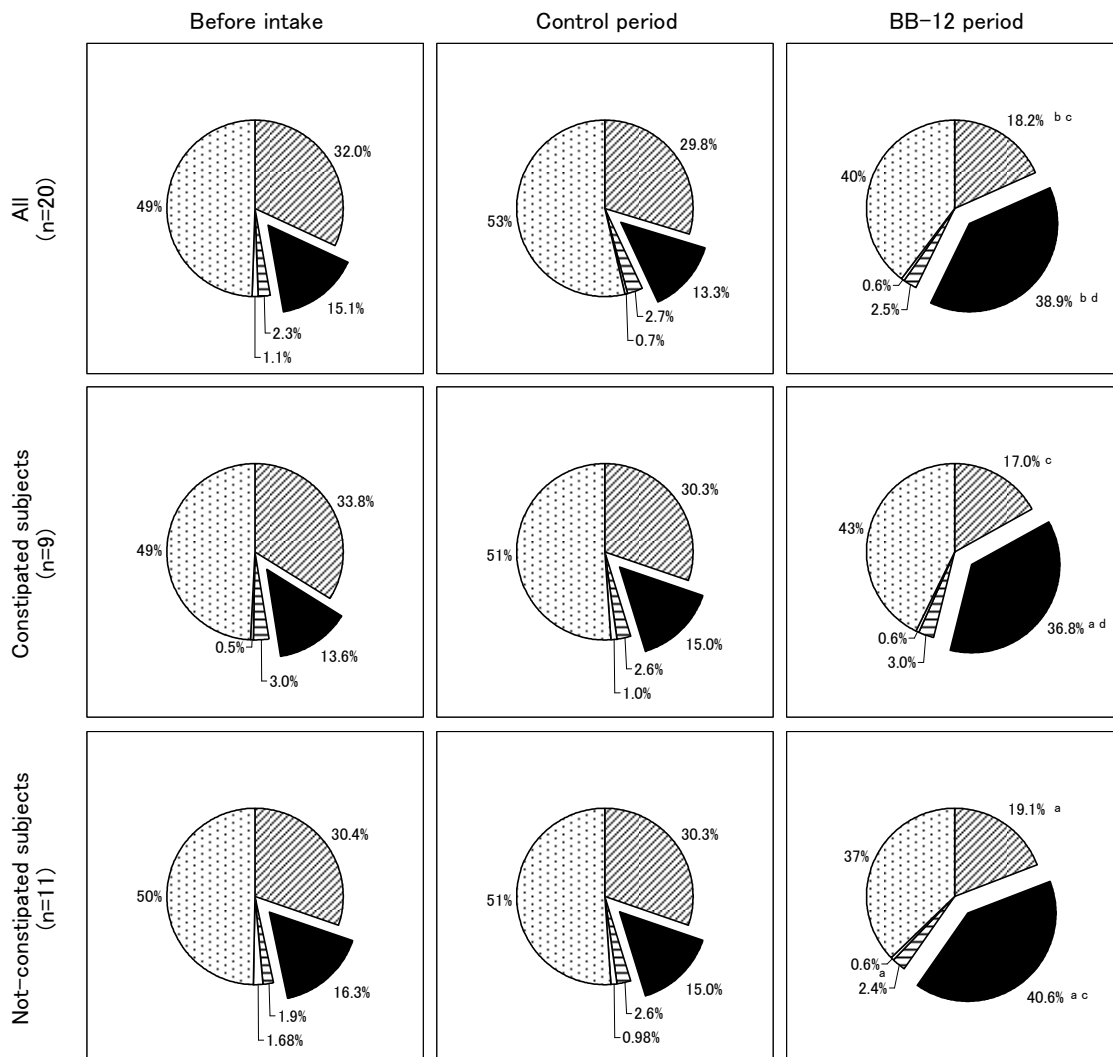


Fig. 2-1-4 Effect of BB-12 yogurt on the ratio of the intestinal microbiota in BB-12 efficacy study.

▨ is Bacteroidaseae, ■ is *Bifidobacterium*, ▤ is *Eubacterium*, □ is *Clostridium lecithinase* (-) and ▤ is Others.

- a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).
- b: Significantly different from before intake ($p < 0.01$).
- c: Significantly different from control period ($p < 0.05$).
- d: Significantly different from control period ($p < 0.01$).

Table 2-1-9 Effect of BB-12 yogurt on the intestinal microbiota in BB-12 dose dependency study.

Group 80g				n=7
	Before intake	Intake	After intake	
Total	10.0 ± 0.2* (100%)**	10.4 ± 0.3 (100%)	10.3 ± 0.4 (100%)	
Total Anaerobes	10.0 ± 0.2 (100%)	10.4 ± 0.3 (100%)	10.3 ± 0.4 (100%)	
Total Aerobes	8.1 ± 0.4 (86%)	8.0 ± 0.1 (100%)	7.6 ± 0.7 (100%)	
Bacteroidaceae	9.3 ± 0.3 (100%)	9.6 ± 0.8 (100%)	9.9 ± 0.7 (100%)	
<i>Bifidobacterium</i>	9.0 ± 0.2 (100%)	9.7 ± 0.8 (100%) ^{ab}	9.2 ± 0.7 (100%)	
<i>Eubacterium</i>	9.1 ± 0.3 (100%)	9.0 ± 1.4 (100%)	8.2 ± 0.2 (100%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(+)	4.5 ± 0.9 (43%)	2.4 ± 0.7 (38%)	6.1 ± 0.5 (38%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(-)	8.7 ± 0.9 (100%)	8.5 ± 0.6 (100%)	8.9 ± 1.1 (100%)	
<i>Lactobacillus</i>	6.2 ± 0.5 (100%)	5.5 ± 0.8 (100%)	5.7 ± 1.2 (100%)	
<i>Streptococcus</i>	6.4 ± 0.5 (86%)	6.4 ± 0.5 (100%)	6.4 ± 0.7 (100%)	
Enterobacteriaceae	7.1 ± 0.2 (86%)	7.4 ± 0.5 (88%)	7.1 ± 0.2 (100%)	
Group 150g				n=8
	Before intake	Intake	After intake	
Total	10.4 ± 0.1 (100%)	10.7 ± 0.6 (100%)	10.3 ± 0.2 (100%)	
Total Anaerobes	10.4 ± 0.1 (100%)	10.6 ± 0.6 (100%)	10.3 ± 0.2 (100%)	
Total Aerobes	8.2 ± 0.3 (100%)	8.6 ± 0.8 (100%)	8.3 ± 0.6 (100%)	
Bacteroidaceae	9.6 ± 0.3 (100%)	10.0 ± 0.0 (100%)	10.0 ± 0.2 (100%)	
<i>Bifidobacterium</i>	9.3 ± 0.2 (100%)	10.3 ± 0.5 (100%) ^a	9.6 ± 0.5 (100%)	
<i>Eubacterium</i>	9.1 ± 0.2 (100%)	8.7 ± 0.7 (100%)	9.0 ± 0.0 (100%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(+)	4.5 ± 0.9 (75%)	2.4 ± 0.8 (25%) ^a	7.1 ± 0.5 (38%)	
<i>Clostridium</i> lecithinase(-)	8.5 ± 0.8 (100%)	8.3 ± 0.5 (100%)	8.4 ± 0.6 (100%)	
<i>Lactobacillus</i>	7.9 ± 1.3 (88%)	6.4 ± 0.7 (100%)	7.5 ± 0.8 (100%)	
<i>Streptococcus</i>	8.3 ± 0.7 (100%)	6.8 ± 1.1 (100%) ^b	7.7 ± 1.0 (100%)	
Enterobacteriaceae	7.8 ± 0.9 (100%)	7.7 ± 1.0 (100%)	8.0 ± 0.2 (100%)	

* Log₁₀ of bacteria count (cfu), mean ± SD.

**Frequency of occurrence.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).

b: Significantly different from after intake ($p < 0.05$).

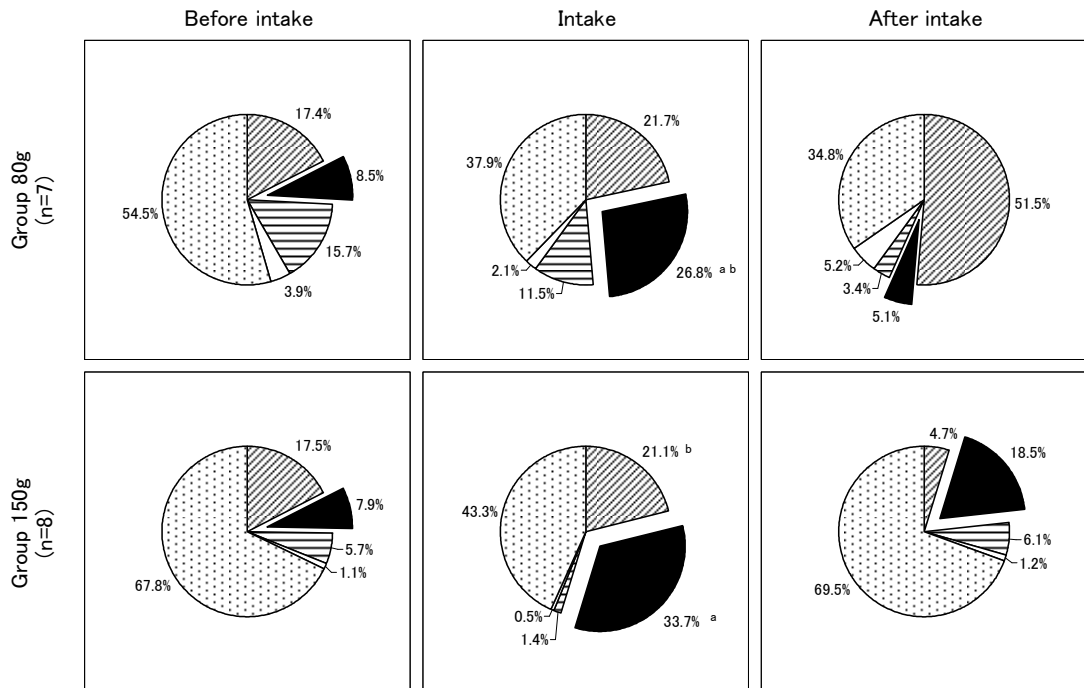


Fig. 2-1-5 Effect of BB-12 yogurt on the ratio of the intestinal microbiota in BB-12 dose dependency study.

▨ is Bacteroidaseae, ■ is *Bifidobacterium*,
 ▤ is *Eubacterium*, □ is *Clostridium lecithinase* (-) and ◻ is Others.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).

b: Significantly different from after intake ($p < 0.05$).

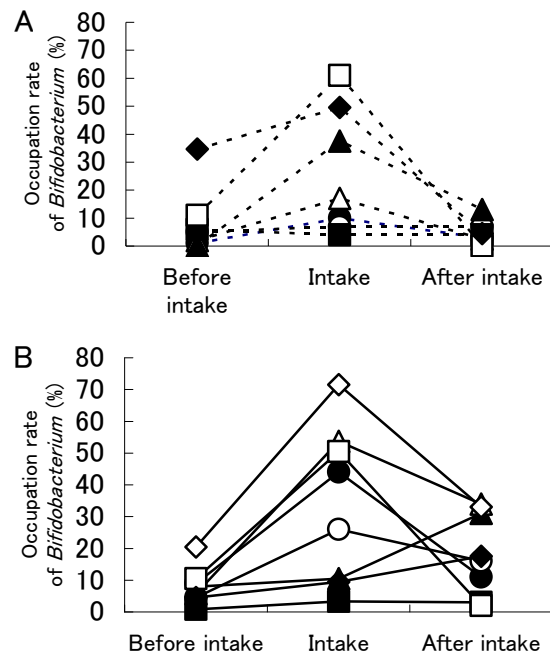


Fig. 2-1-6 Changes in occupation rate of *Bifidobacterium* in the intestinal microbiota in each subject in BB-12 dose dependency study.

A, 80g/day ingested group. B, 150g/day ingested group.

- is subject 1, -○- is subject 2,
- ▲- is subject 3, -△- is subject 4,
- is subject 5, -□- is subject 6,
- ◆- is subject 7 of 80g/day ingested group.
- is subject 9, -○- is subject 10,
- ▲- is subject 11, -△- is subject 12,
- is subject 13, -□- is subject 14,
- ◆- is subject 15, -◇- is subject 16, of 150g/day ingested group.

II-1-3-4 糞便水分、アンモニア量、pH、乳酸および SCFA 量

II-1-3-4-1 BB-12 有効性試験

糞便水分、アンモニア量、pH の測定結果を Table 2-1-10 に示した。被験者全体における糞便水分は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。糞便 pH は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期および対照ヨーグルト摂取期に比べて有意に($p < 0.05$)低下した。

非便秘傾向者群における糞便 pH は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に ($p < 0.05$) 低下した。

その他の項目では有意な差は見られなかった。

乳酸および SCFA 量の測定結果を Table 2-1-11 に示した。被験者全体における乳酸量は、対照ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。酢酸量は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)増加し、対照ヨーグルト摂取期でも事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。酪酸量は、BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比べて有意に($p < 0.05$)増加した。吉草酸量は、BB-12 ヨーグルト摂取期、対照ヨーグルト摂取期ともに、事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。SCFA 量合計では、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)増加し、対照ヨーグルト摂取期でも事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。

便秘傾向者群においては、全ての項目で有意な差は見られなかった。

非便秘傾向者群における乳酸量は、対照ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に増加した。酢酸量は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.01$)増加した。酪酸量は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。吉草量酸は、BB-12 ヨーグルト摂取期、対照ヨーグルト摂取期ともに事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。SCFA 量合計は、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)増加した。その他の項目では、有意な差は見られなかった。

II-1-3-4-2 BB-12 摂取量依存性試験

糞便水分、アンモニア量、pH の測定結果を Table 2-1-12 に示した。80 g 群および 150 g 群においてアンモニア量は、摂取期で事前観察期に比べて有意に($p < 0.05$)低値を示した。その他の項目では有意な差は見

られなかった。

Table 2-1-10 Effect of BB-12 yogurt on the intestinal moisture, ammonia and pH in BB-12 efficacy study.

	All		n=20	
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Moisture (%)	69.3 ± 4.5 *	71.3 ± 5.8	71.4 ± 6.5 ^a	
Ammonia (μg/g)	853 ± 329	852 ± 344	928 ± 331	
pH	7.5 ± 0.6	7.3 ± 0.7	7.1 ± 0.6 ^a	
		Constipated subjects		n=9
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Moisture (%)	71.4 ± 4.6	72.6 ± 6.1	73.0 ± 6.1	
Ammonia (μg/g)	744 ± 213	943 ± 367	942 ± 369	
pH	7.5 ± 0.7	7.3 ± 0.7	7.1 ± 0.6	
		Not constipated subjects		n=11
	Before intake	Control period	BB-12 period	
Moisture (%)	67.7 ± 3.9	70.2 ± 5.7	70.2 ± 6.7	
Ammonia (μg/g)	942 ± 387	784 ± 325	918 ± 313	
pH	7.5 ± 0.6	7.2 ± 0.7	7.1 ± 0.6 ^a	

* Mean ± SD.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).

Table 2-1-11 Effect of BB-12 yogurt on lactic acid and SCFA in feces in BB-12 efficacy study.

	All				n=20	
	Before intake		Control period		BB-12 period	
Lactic acid ($\mu\text{g/g}$)	6 \pm	19 *	28 \pm	47 ^a	54 \pm	126
Formic acid ($\mu\text{g/g}$)	103 \pm	61	96 \pm	49	104 \pm	45
Acetic acid ($\mu\text{g/g}$)	6503 \pm	2229	7960 \pm	2772 ^a	8227 \pm	2225 ^b
Propionic acid ($\mu\text{g/g}$)	997 \pm	358	1100 \pm	404	1130 \pm	465
Isobutyric acid ($\mu\text{g/g}$)	202 \pm	54	199 \pm	65	203 \pm	145
Butyric acid ($\mu\text{g/g}$)	675 \pm	439	769 \pm	389 ^c	946 \pm	508
Isovaleric acid ($\mu\text{g/g}$)	185 \pm	105	181 \pm	89	191 \pm	102
Valeric acid ($\mu\text{g/g}$)	90 \pm	102	130 \pm	94 ^a	129 \pm	83 ^a
Total SCFA ($\mu\text{g/g}$)	8755 \pm	2949	10436 \pm	3634 ^a	10929 \pm	2937 ^b
	Constipated subjects				n=9	
	Before intake		Control period		BB-12 period	
Lactic acid ($\mu\text{g/g}$)	0 \pm	0	30 \pm	61	72 \pm	181
Formic acid ($\mu\text{g/g}$)	73 \pm	41	64 \pm	35	94 \pm	51
Acetic acid ($\mu\text{g/g}$)	6859 \pm	2848	7895 \pm	2674	8546 \pm	2850
Propionic acid ($\mu\text{g/g}$)	1062 \pm	440	1190 \pm	501	1280 \pm	559
Isobutyric acid ($\mu\text{g/g}$)	212 \pm	52	214 \pm	61	243 \pm	203
Butyric acid ($\mu\text{g/g}$)	721 \pm	607	717 \pm	377	938 \pm	581
Isovaleric acid ($\mu\text{g/g}$)	202 \pm	102	182 \pm	122	216 \pm	125
Valeric acid ($\mu\text{g/g}$)	103 \pm	113	138 \pm	87	126 \pm	77
Total SCFA ($\mu\text{g/g}$)	9233 \pm	3850	10400 \pm	3505	11443 \pm	3754
	Not constipated subjects				n=11	
	Before intake		Control period		BB-12 period	
Lactic acid ($\mu\text{g/g}$)	11 \pm	25	26 \pm	35 ^a	29 \pm	60
Formic acid ($\mu\text{g/g}$)	128 \pm	65	122 \pm	42	112 \pm	40
Acetic acid ($\mu\text{g/g}$)	6212 \pm	1656	8013 \pm	2979	7965 \pm	1658 ^b
Propionic acid ($\mu\text{g/g}$)	944 \pm	286	1027 \pm	309	1007 \pm	352
Isobutyric acid ($\mu\text{g/g}$)	194 \pm	57	188 \pm	68	170 \pm	69
Butyric acid ($\mu\text{g/g}$)	636 \pm	262	812 \pm	412	953 \pm	469 ^a
Isovaleric acid ($\mu\text{g/g}$)	170 \pm	111	180 \pm	58	171 \pm	79
Valeric acid ($\mu\text{g/g}$)	79 \pm	96	123 \pm	102 ^a	130 \pm	91 ^a
Total SCFA ($\mu\text{g/g}$)	8364 \pm	2070	10465 \pm	3729	10608 \pm	2163 ^a

* Mean \pm SD.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).

b: Significantly different from before intake ($p < 0.01$).

c: Significantly different from control period ($p < 0.05$).

Table 2-1-12 Effect of BB-12 yogurt on fecal moisture, ammonia and pH in BB-12 dose dependency study.

Group 80g				n=7
	Before intake	Intake	After intake	
Moisture (%)	78.9 ± 8.5 *	80.2 ± 4.5	80.1 ± 8.2	
Ammonia (μg/g)	1093 ± 981	682 ± 532 ^a	746 ± 275	
pH	6.5 ± 0.7	6.4 ± 1.0	7.4 ± 0.3	
Group 150g				n=8
	Before intake	Intake	After intake	
Moisture (%)	78.6 ± 2.7	79.2 ± 7.5	77.1 ± 5.3	
Ammonia (μg/g)	1384 ± 472	872 ± 355 ^a	722 ± 258	
pH	6.2 ± 0.3	6.6 ± 0.7	6.5 ± 0.6	

* Mean ± SD.

a: Significantly different from before intake ($p < 0.05$).

II-1-4 考察

近年、若年女性では 2 人に 1 人が便秘傾向といわれている³²⁾。便秘症は糞便の腸での滞留時間が長くなり、有害菌が増殖することを指し、これらが産生する有害物質は様々な疾病や老化の原因として考えられている³³⁾。このように日常生活の中で頻繁に発生する便秘は、長期的には健康長寿を脅かし、短期的には便通が滞ることから腹部不快感を誘発し QOL を下げる。この問題を解決するために BB-12 の整腸効果を評価した。

まず、BB-12 の整腸効果を確かめるために BB-12 有効性試験を行った。便性には個人差があり、画一的に理想的な状態を規定することは難しく、また便秘も、単に排便回数が少ないということではない。しかし、一般的には便通は 24 時間から 48 時間に 1、2 回規則正しくあるのが普通で、便秘の場合は 3 日から数日に 1 回の排便であることが多い³⁴⁾。そのため、本節では排便回数が 1 週間あたり 4 回以下の被験者を便秘傾向者として、被験者全体に加え、便秘傾向者群および非便秘傾向者群に分け解析を行った。

食品を摂取してから便として排出されるまでの時間は、人種にもよるが通常 36~72 時間程度とされている²⁴⁾。また、便秘の場合は 3 日から数日に 1 回の排便であることが多い³⁴⁾ことから、本節では、排便状況および糞便性状の調査については、事前観察期、BB-12 ヨーグルト摂取期、対照ヨーグルト摂取期の各期 14 日間のうち、最初の 3 日間を除外してその後の 11 日間を採用し、期が変わる前の食事の便通への影響を排除して解析に用いた。

BB-12 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比べて、被験者全体では、Bacteroidaceae 菌数の減少、*Bifidobacterium* 菌数の増加、Bacteroidaceae 占有率の低下、*Bifidobacterium* 占有率の上昇および酪酸量の増加が見られた。便秘傾向者群では排便日数の増加、Bacteroidaceae 占有率の低下、*Bifidobacterium* 菌数の増加、Bacteroidaceae 占有率の上昇および Enterobacteriaceae 占有率の低下が見られた。非便秘傾向者では、*Bifidobacterium* 菌数の増加および *Bifidobacterium* 占有率の上昇が見られた。

事前観察期とヨーグルト摂取期の比較では、BB-12 ヨーグルト摂取期で事前観察期と比べて、被験者全体では、排便日数の増加、排便量の増加、*Bifidobacterium* 菌数の増加、*Lactobacillus* 菌数の増加、Bacteroidaceae 占有率の低下、*Bifidobacterium* 占有率の上昇、*Lactobacillus* 占有率の上昇、糞便水分の

増加、pH の低下、糞便酢酸量の増加、吉草酸量の増加および SCFA 量の増加が見られた。便秘傾向者群では、排便回数の増加、排便日数の増加、排便量の増加、糞便形状の「カチカチ」から「バナナ状」への変化、総好気性菌の減少、*Bifidobacterium* 占有率の上昇および総好気性菌占有率の低下が見られた。非便秘傾向者群では、*Bifidobacterium* 菌数の増加、*Clostridium lecithinase*(-) 菌数の減少、*Lactobacillus* 菌数の増加、Bacteroidaceae 占有率の低下、*Bifidobacterium* 占有率の上昇、*Clostridium lecithinase*(-) 占有率の低下、*Lactobacillus* 占有率の上昇、糞便 pH の低下、糞便酢酸量の増加、酪酸量の増加、吉草酸量の増加および SCFA 量の増加が見られた。

一方、対照ヨーグルト摂取期で事前観察期と比べて、被験者全体では、排便日数の増加、糞便乳酸量の増加、酢酸量の増加、吉草酸量の増加および SCFA 量の増加が見られた。便秘傾向者群では、排便回数の増加、排便日数の増加および排便量の増加がみられた。非便秘傾向者群では、糞便乳酸量の増加および吉草酸量の増加が見られた。

対照ヨーグルトは、*S. thermophilus*, *Lc. lactis* の他に整腸効果が確認されている *L. acidophilus* を含有しているため、対照ヨーグルト摂取期でもある程度の整腸効果を示した。しかし、BB-12 ヨーグルト摂取期では、対照ヨーグルト摂取期を上回る整腸効果を示しており、この効果は BB-12 によるものであることが確認された。

被験者を便秘傾向者と非便秘傾向者に分けて解析すると、便秘傾向者は、対照ヨーグルト摂取期および事前観察期と比べて腸内細菌叢の改善とともに便性の改善も見られている。一方、非便秘傾向者でも、*Bifidobacterium* 菌数の増加や *Bifidobacterium* 占有率の上昇が見られ、また *Clostridium lecithinase*(-) の抑制も見られていることから腸内細菌叢の改善は見られたが、排便回数および排便日数の増加は見られなかった。このことにより、非便秘傾向者は、もともと排便回数および排便日数は良い状態にあり、BB-12 ヨーグルトの摂取で排便回数および排便日数はあまり変化しないことを示す一方で、排便回数および排便日数が過剰に増加し、良い状態から逸脱することもないことが示唆された。

被験者全体および非便秘傾向者群で、対照ヨーグルト摂取期で事前観察期に比べて乳酸量が有意に増加した。BB-12 ヨーグルト摂取期では有意な増加は見られなかったが、乳酸量の平均値は BB-12 ヨーグル

ト摂取期が対照ヨーグルト摂取期を上回っていることから、両群間の乳酸量の差による整腸効果への影響は小さいと考えられた。

Bifidobacterium は、糖質を分解し乳酸や酢酸などの SCFA を産生する。産生された SCFA の影響により腸管内の pH が低下し、Bacteroidaceae 等の有害菌の増殖および腸内腐敗産物の生成が抑制され、また SCFA が腸管の上皮細胞に働きかけることで腸管の蠕動運動が活発化され排便が促進される^{9), 35), 36)}。

本試験でも、BB-12ヨーグルト摂取期で *Bifidobacterium* 菌数が増加し占有率が上昇し糞便の pH が低下した。しかし、SCFA 量は排便頻度が上がった便秘傾向者群では変化せず、排便頻度に変化がなかった非便秘傾向者群で増加した。便秘傾向者群では非便秘傾向者群に比べ糞便は大腸により長く滞留し、SCFA はより多く腸管に吸収される可能性があり、その結果、糞便中の SCFA 量の変化が少なかったと考えられた。この点をより明確に理解するためには腸管通過時間を測定する必要があると考えた。

以上のことから、BB-12 の摂取で、排便状況、腸内細菌叢および腸内環境が改善され、整腸効果が期待できることが確認され、さらなる整腸効果理解のために腸管通過時間の測定が必要だと考えた。

続いて 1 日当たり摂取量 100g の前後で摂取量依存性を評価した。ヨーグルトの 1 日の摂取量は場合により様々であり、一概に標準的摂取量を求めるのは難しいが、一般には日本人では 1 日 1 回 80 g から 150g 程度であると考えられる²⁶⁾。ここでは、本ヨーグルトの効果発現の摂取量依存性を検討するとともに、過剰量摂取時の随伴症状の有無を検討した。

BB-12 摂取量依存性試験の摂取期では、事前観察期または事後観察期と比べて、80g 群では、*Bifidobacterium* 菌数の増加および占有率の上昇および糞便アンモニア量の低下が見られた。

150g 群では、排便量の増加、糞便の色の黄色化、Bacteroidaceae 占有率の低下、*Bifidobacterium* 菌数の増加および占有率の上昇、*Clostridium* lecithinase(+)菌数の減少および占有率の低下、*Streptococcus* 菌数の減少および占有率の低下および糞便アンモニア量の低下が見られた。

個人別 *Bifidobacterium* 占有率では、80g 群で 7 例中 6 例で、150g 群で 8 例中 8 例という高い率で *Bifidobacterium* 占有率が上昇したが、増加の程度は大きな差があり、個人ごとに感受性の差があることが示唆された。

Bifidobacterium の菌数は、両群において摂取期では事前観察期と比べて有意に高値を示し、事後観察期には速やかに減少した。従って、BB-12 ヨーグルトの 80g/日または 150g/日の摂取により、腸内 *Bifidobacterium* が増加することが確認された。150 g 群では摂取期と事後観察期の菌数に有意な差が認められず、摂取期に摂取した *Bifidobacterium* が完全に排出されなかった可能性が考えられた。このことにより、BB-12 ヨーグルトの 150g/日の摂取により、整腸効果がより長期間持続する可能性が示唆された。

Bifidobacterium は腸内環境を改善しヒトの健康に寄与すると考えられている¹⁹⁾。一方、Bacteroidaceae、*Clostridium* lecithinase(+)および *Streptococcus* は、腸内腐敗細菌として、またアンモニアは腸内腐敗産物として、ヒトの健康に悪影響をもたらすと考えられている^{25), 27)}。80g 群、150g 群ともに腸内細菌叢の改善および糞便内腐敗産物であるアンモニア量の低下が見られ、腸内環境の改善が確認された。また、150g 群では排便状況を含めて整腸効果がより明確に観察され、BB-12 ヨーグルトの整腸効果は摂取量依存的に高まること、最低有効摂取量は 100g/日程度であった。

さらにBB-12 過剰量摂取試験では、摂取期中に事前観察期または事後観察期と比べて、排便回数と排便量は多くなり、その他の項目も、BB-12 摂取量依存性試験と類似した整腸効果が発現することが確認された。また、過剰量摂取しても排便状況や糞便性状が激変し下痢様の状態になることはないことが確認された。さらに、随伴症状を調査した結果、体調不良等の異常所見は観察されなかったことから、BB-12 ヨーグルトを過剰量摂取しても、安全性に問題はないことが確認された。

BB-12 摂取量依存性試験とBB-12 過剰量摂取試験では事後観察期を設け、BB-12 摂取を止めた後の観察を行った。BB-12 過剰量摂取試験では、便の形状が事後観察期で摂取期に比べより硬くなった。また、BB-12 摂取量依存性試験の 80g 群で、Bacteroidaceae の菌数と占有率の平均値が上がった。有意な変化ではなかったが、変化量は大きかった。これまでのプロバイオティクスのヒトでの評価は摂取前と摂取時、または対照との比較が中心で摂取時と摂取後の比較検討はあまりなされてこなかった。しかし、プロバイオティクス摂取の影響をより深く理解するためには、今後この観点も注目すべきであると考えられた。

II-1-5 結論

本節において、BB-12 ヨーグルト摂取で発現する整腸効果は主として BB-12 によって誘導されること、BB-12 ヨーグルトの整腸効果には摂取量依存性があり、その最低有効摂取量は 100g/日であること、過剰量として 100g/日の 4.5 倍となる 450g/日の BB-12 ヨーグルトを摂取しても健康上の問題を起こさないことを確認した。

結論として、BB-12 はヨーグルトに含まれる形態で摂取すると整腸効果を発現することが明らかとなった。

第2節 *Bifidobacterium lactis* DN173010 のヨーグルト摂取ヒト無作為化比較試験での腸管通過時間を中心とした整腸効果の評価

II-2-1 緒言

第II章第1節の研究により、BB-12に整腸効果があることが確認された。本節では、BB-12と同菌種であるDN173010を用いることでBB-12と株は異なるが同種のプロバイオティクスの整腸効果を評価した。

便秘、炎症性腸症候群等の腸の不調はバランスの悪い食習慣と関連していると考えられていて^{37), 38)}、食餌と腸の機能、および疾病の罹患は相互に影響している³⁹⁾。BB-12、DN173010ともにこれまでの研究により腸内細菌叢を改善し、その優勢種の一つ *Bifidobacterium* を増加させ、宿主の健康に有益な影響を与える^{40), 41)}。例えば、整腸効果^{9), 10), 14), 22), 42-44)}、さらに、腸管感染症予防効果⁴⁵⁾、抗アレルギー効果^{46), 47)}、抗高脂血症効果⁴⁸⁾、抗高血圧症効果⁴⁹⁾などが報告されている。

DN173010はヒトの消化管を生きて通過し大腸に届くプロバイオティクスの活性を持つことが確認されている^{50), 51)}。また、欧州でヒトにおける消化管への影響、特に食物が消化管をどのような速度で通過していくかの評価した報告が複数ある⁵²⁻⁵⁵⁾。しかし、これまで日本人を対象とした研究はなされていない。人種や地域により食習慣や生活習慣、さらには健康面での問題も異なるため、機能性食品の有効性は人種毎に評価すべきである。さらに、DN173010の排便頻度や排便量、腸内細菌叢および腸内環境の改善といった整腸効果についての総合的評価はされていない。本節では、健康な日本人を対象としてDN173010を含有するヨーグルトの摂取による総合的整腸効果を検討するため、DN173010有効性試験を実施した。試験デザインは、無作為化二重盲検対照比較クロスオーバー試験(RCT)とし、二重盲検化することでBB-12有効性試験よりもさらに試験の信頼性を向上させた。1日あたり摂取量は、第1節で求めた最低有効摂取量である100g/日を上回り、かつ市販単位である1個あたり85gの整数倍で最少量の170g/日とした。

II-2-2 材料と方法

II-2-2-1 試験食品

試験食品の組成を Table 2-2-1 に示す。DN173010 ヨーグルトは DN173010、*Streptococcus thermophilus*、*Lactococcus lactis*、*Lactobacillus bulgaricus* で発酵させ、DN173010 を 10^8 cfu/g 以上とした。対照ヨーグルトは *S. thermophilus*、*Lc. lactis*、*L. bulgaricus* で発酵させた。ヨーグルトの pH は 4.20~4.65、栄養成分は 1 日摂取量 170g あたりエネルギー 142kcal、たんぱく質 7.3g、脂肪 4.9g、炭水化物 18.2g、ナトリウム 104mg、カルシウム 255mg とした。

Table 2-2-1 Composition of DN173010 yogurt and control yogurt with 170g.

	DN173010 yogurt	Control yogurt
Energy	142 kcal	142 kcal
Protein	7.3 g	7.3 g
Lipids	4.9 g	4.9 g
Carbohydrates	18.2g	18.2g
Na	104 mg	104 mg
Ca	255 mg	255 mg
DN173010	1.7×10^{10} cfu*	0 cfu
<i>L. bulgaricus</i>	1.7×10^8 cfu<	1.7×10^8 cfu<
<i>S. thermophilus</i>	1.7×10^9 cfu<	1.7×10^9 cfu<
<i>Lc. lactis</i>	1.7×10^8 cfu<	1.7×10^8 cfu<

*cfu: Colony forming unit.

II-2-2-2 被験者

本試験は、昭和女子大学に在籍する健常人女性 50 名を対象として行った。被験者の平均年齢は 19.43 歳（標準偏差 1.62 歳）、平均 BMI は 20.33（標準偏差 2.11）、週当たりの平均排便頻度は 5.97 回（標準偏差 1.54）であった。試験期間中、被験者に対して本試験で提供される試験食品以外のヨーグルトや乳酸菌飲料および納豆を摂取しないよう、さらにオリゴ糖、食物繊維、その他腸内細菌叢に影響を及ぼす食品を摂取しないように指示した。また、便秘薬、下剤、整腸剤、制酸剤、その他腸内細菌叢および便性状に影響を及ぼす薬物を常用しないよう指示した。それ以外の食事については特に指示しなかった。なお、本試験はヘルシンキ宣言の精神に従い、試験計画は Danone および昭和女子大学倫理委員会の承認を得た。被験者には試験内容を十分に説明し、試験実施前に書面による同意を得て実施した。

II-2-2-3 DN173010 有効性試験デザイン

無作為化二重盲検対照比較クロスオーバー試験(RCT)とした。試験スケジュールを Fig. 2-2-1 に示した。試験開始前に日常の 1 週間あたりの排便頻度および生活習慣等をアンケートにて調査し、被験者を無作為で 2 群(A 群、B 群)に分け、排便頻度に偏りがないことを確認した。DN173010 ヨーグルトと対照ヨーグルトを用いた二重盲検クロスオーバー試験とした。はじめに観察期(2 週間)として試験食品を摂取しない期間を設けた。次に摂取第 1 期(2 週間)として A 群は DN173010 ヨーグルト、B 群は対照ヨーグルトを摂取した。次に休止期(6 週間)として A 群 B 群ともに試験食品を摂取しない期間を設定した。最後に摂取第 2 期(2 週間)として A 群は対照ヨーグルト、B 群は DN173010 ヨーグルトを摂取した。摂取期には試験食品を 1 日に 170g(85g × 2 個)ずつ、任意の時間に摂取した。なお、試験食品が DN173010 ヨーグルトであるか対照ヨーグルトであるかは被験者に告知しなかった。

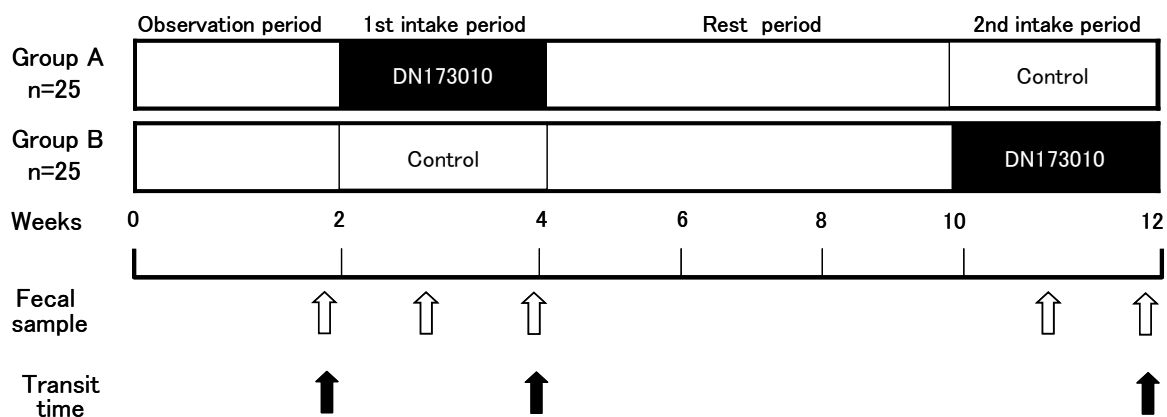


Fig. 2-2-1 Schedule of DN173010 efficacy study.

Fecal samples were collected at marked timing.

DN173010: DN173010 yogurt intake period. Control: Control yogurt intake period.

II-2-2-4 試験中の生活および便性の調査

被験者に毎日日誌の記入を依頼し、便性(排便状況として排便頻度と排便量、糞便性状として糞便の色と糞便の形状、制限食品および薬物の摂取の有無、生活習慣、体調および試験食品摂取の有無を調査した。排便量は直径 20mm、長さ 50mm の円柱棒の本数に換算した。糞便の形状は 1:水状、 2:泥状、 3:半練状、 4:バナナ状、 5:カチカチ状、 6:コロコロ状 とし点数を記録した。色は JIS Z8721 から、1:5Y8/12(黄色)、 2:2.5Y7/12(薄い黄土色)、 3:10YR5/8(黄土色)、 4:7.5YR7/12(茶色)、 5:5Y4/4(こげ茶色)、 6:2.5GY4/3(黒に近いこげ茶色)の標準色を被験者に配布し最も近い色を点数で記録した。

II-2-2-5 腸管通過時間の測定

観察期、摂取第 1 期、および摂取第 2 期の最後にカラーマーカーを摂取し、食物の腸管通過時間を測定した。カラーマーカーは食品添加物である青色 2 号をゼラチンソフトカプセルで抱合したものをを用いた。カラーマーカーカプセルを 1 回に 1 個摂取してから糞便に青色が確認されるまでの時間を腸管通過時間とした。

II-2-2-6 腸内細菌叢の検索

被験者 50 名のうち同意の得られた 20 名に糞便サンプル採取を依頼し、14 名についてサンプルを得た。観察期の最後の 3 日間、摂取第 1 期の中間と最後の 3 日間、摂取第 2 期の中間と最後の 3 日間で各 1 回糞便サンプルを採取した。糞便 1 回分の全量をポリ袋に採取し、脱酸素剤(アネロパックケンキ、三菱ガス化学(株))とともに酸素非透過性の容器に入れて保冷剤にて低温に維持した。光岡らの方法に準じて採取した糞便より腸内細菌叢を検索した²⁵⁾。すなわち、糞便を均質化した後、0.09%寒天を添加した滅菌生理食塩水に懸濁、段階希釈し、平板培地に塗布し、培養後各細菌数を測定した。検索対象とする菌および培地は、総嫌気性菌には EG 寒天培地および BL 寒天培地、総好気性菌には TS 寒天培地、*Bifidobacterium* には BL 寒天培地および BS 寒天培地、*Bacteroidesae* にはバクテロイデス寒天培地、*Eubacterium* には ES 寒天培地、*Clostridium* lecthinase (-)には Clostridia 寒天培地、*Clostridium* lecthinase (+)には CW 寒天培地、*Lactobacillus*には変法 LBS 寒天培地、*Streptococcus*には TATAC 寒天培地、*Enterobacteriaceae*には DHL

寒天培地、*Staphylococcus* には PEES 寒天培地、*Bacillus* には TS 寒天培地、Yeast には PDA 寒天培地をそれぞれ用いた。生菌数は糞便 1g あたりの常用対数 (\log_{10} cfu/g) で示した。総菌数は総嫌気性菌数と総好気性菌数の合計とした。摂取第 1 期と摂取第 2 期では、中間と最後のデータを平均した。占有率は総菌数に対する比率とした。出現率は被験者の内当該菌を検出した比率とした。

II-2-2-7 糞便中の pH、水分、アンモニア量および SCFA 量の測定

pH は pH メーター (Twin、堀場製作所株) の電極を直接糞便に接触させて測定した。水分は、糞便 1g を -80°C で 24 時間以上凍結させた後、真空乾燥機 (DP シリーズ、ヤマト科学株) にて 48 時間真空乾燥させ、乾燥前後の重量差により算出した。アンモニア量は、糞便 1g を 2% 過塩素酸にて懸濁し遠心分離した後、上澄を糞便重量に対し 2% 過塩素酸で 1000 倍希釈しアンモニア測定キット (アンモニアテストワコー、和光純薬工業株) を用いて測定した。SCFA 量は、有機酸分析セット ShodexOA (昭和電工株) を用いてギ酸量、酢酸量、プロピオン酸量、イソ酪酸量、酪酸量、イソ吉草酸量および吉草酸量を測定し、これらの合計とした。

II-2-2-8 統計処理方法

腸管通過時間、排便頻度、排便量、糞便の形状、色、各腸内細菌菌数および占有率、pH、水分、アンモニア量、SCFA 量の比較は、対応のある Wilcoxon 符号付順位和検定を用いて行った。危険率 (p) が 0.05 未満の場合を有意差があると判断し、0.05 以上 0.1 未満の場合を差がある傾向があるとした。統計ソフトは、SPSS16.0J を用いた。

II-2-3 結果

II-2-3-1 被験者

試験期間中、被験者の健康状態に本試験および試験食品が原因と見られる異常所見は観察されなかった。50名の被験者のうち、3名が途中で試験を中止した。中止理由は自己都合が2名、風邪による大腸不調が1名であった。また、4名が摂取第1期または摂取第2期中に抗生物質を服用したため解析には用いなかった。従って、7名を解析対象外とし、43名を解析に用いた。

II-2-3-2 腸管通過時間および便性

腸管通過時間については、43名のうち8名でカラーマーカの糞便への排出が確認できなかったため解析対象外とし、35名を解析対象とした。観察期での腸管通過時間測定において、40時間未満であった被験者を”Fast transit time (FTT)” 群とし、40時間以上であった被験者を”Slow transit time (STT)” 群とした。腸管通過時間解析対象の35名 Total と、FTT 群 18名および STT 群 17名に層別した結果を、Fig. 2-2-2 に示した。STT 群において DN173010 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比較して短縮される傾向が観察され($p=0.055$)、FTT 群では変らなかった。

Total 43名と、FTT 群 18名および STT 群 17名に層別した排便頻度の結果を、Fig. 2-2-3 に示した。STT 群において、DN173010 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比較して有意に排便頻度が増加した。また観察期と比較して、DN173010 ヨーグルト摂取期と対照ヨーグルト摂取期ともに有意に増加したが、その増分は観察期と DN173010 ヨーグルト摂取期の間で 2.23 回/week、観察期と対照ヨーグルト摂取期の間で 1.34 回/week と DN173010 ヨーグルト摂取期の方が大きく増加した。Total と FTT 群では有意な変化はなかった。全体 43名と、FTT 群 18名および STT 群 17名に層別した排便量の結果を、Fig. 2-2-4 に示した。全体、FTT 群、STT 群ともに、DN173010 ヨーグルト摂取期で観察期と比較して有意に増加し、STT 群で最も大きく増加した。糞便の色と形状の結果を Table 2-2-2 に示した。有意な差は観察されなかった。

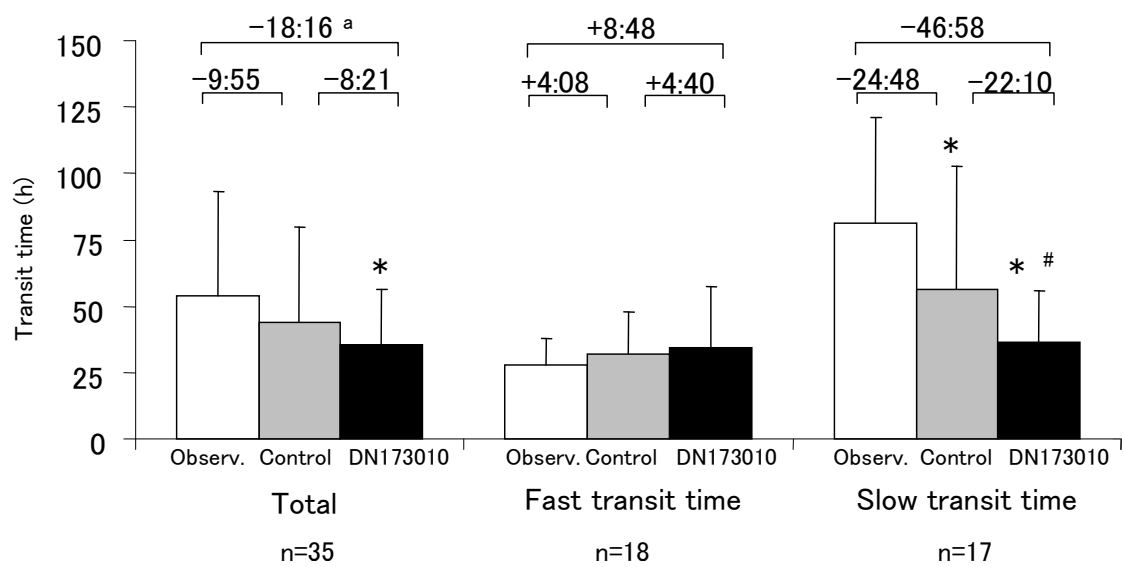


Fig. 2-2-2 Effect on intestinal transit time in DN173010 efficacy study. Values represent mean \pm SD. Observ.: Observation period. Control: control yogurt intake period. DN173010: DN173010 yogurt intake period. a: The gaps of hours between each period were indicated over the bars with signed numbers. *Significantly different compared with Observ. ($p < 0.05$). # $p = 0.055$ compared with Control.

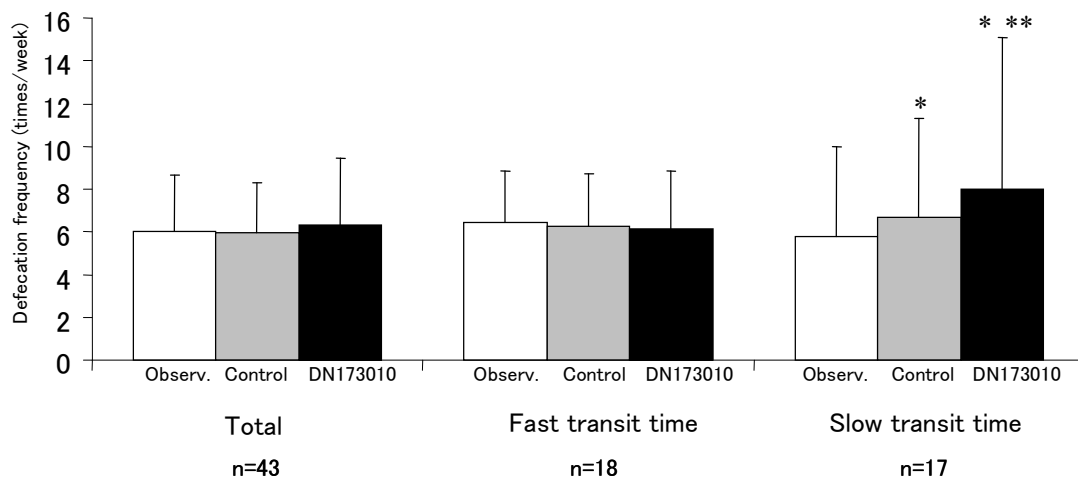


Fig. 2-2-3 Effect on defecation frequency in DN173010 efficacy study.
 Values represent mean \pm SD.
 Observ.: observation period. Control: control yogurt intake period.
 DN173010: DN173010 yogurt intake period.
 *Significantly different compared with Observ. ($p < 0.05$).
 **Significantly different compared with Control ($p < 0.05$).

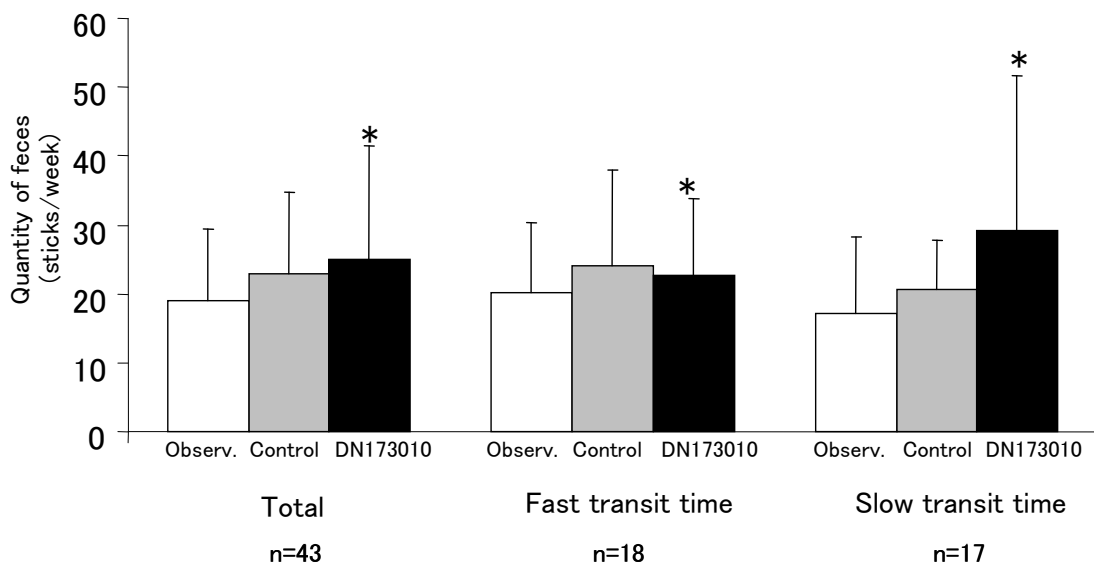


Fig. 2-2-4 Effect on quantity of feces in DN173010 efficacy study.
 Values represent mean \pm SD.
 Observ.: observation period. Control: control yogurt intake period.
 DN173010: DN173010 yogurt intake period.
 *Significantly different compared with Observ. ($p < 0.05$).

Table 2-2-2 Color and shape of feces in DN173010 efficacy study.

		Total				n=43	
		Observation		Control		DN173010	
Color		3.47 ±	0.67	3.35 ±	0.65	3.38 ±	0.73
Shape		2.83 ±	0.83	2.68 ±	0.71	2.77 ±	0.88

		Fast transit time				n=18	
		Observation		Control		DN173010	
Color		3.35 ±	0.67	3.25 ±	0.72	3.36 ±	0.80
Shape		2.86 ±	0.87	2.68 ±	0.71	2.83 ±	0.84

		Slow transit time				n=17	
		Observation		Control		DN173010	
Color		3.67 ±	0.64	3.52 ±	0.73	3.43 ±	0.62
Shape		2.78 ±	0.78	2.50 ±	0.67	2.67 ±	0.98

Values represent mean ± SD.

II-2-3-3 腸内細菌叢

腸内細菌の占有率を Fig. 2-2-5 に示した。*Bifidobacterium* では DN173010 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比較して有意に上昇した。観察期と DN173010 ヨーグルト摂取期を比較すると、Bacteroidesae は低下、*Bifidobacterium* は上昇、*Clostridium* lecithinase(-) は低下した。観察期と対照ヨーグルト摂取期を比較すると、Bacteroidesae が低下した。

各腸内細菌の菌数を Table 2-2-3 に示した。DN173010 ヨーグルト摂取期と対照ヨーグルト摂取期を比較すると、*Bifidobacterium* は有意に増加し、*Clostridium* lecithinase(+) は有意に減少した。この 2 菌種は観察期と DN173010 ヨーグルト摂取期の比較でも有意な差があったが、観察期と対照ヨーグルト摂取期では有意な差はなかった。

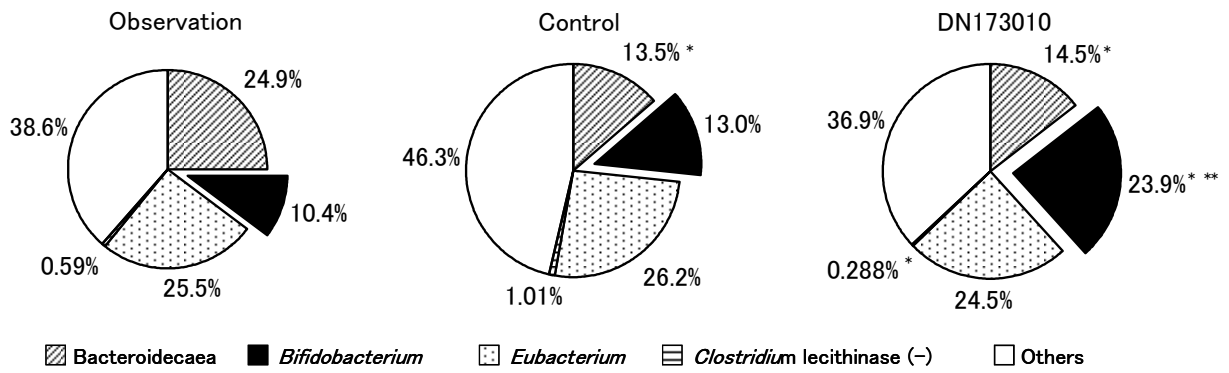


Fig. 2-2-5 The ratio of the intestinal microbiota in DN173010 efficacy study. (n=14)
 Values represent mean.
 *Significantly different compared with Observation ($p < 0.05$).
 **Significantly different compared with Control ($p < 0.05$).

Table 2-2-3 Effect on the intestinal microbiota in DN173010 efficacy study.

	n=14					
	Observation		Control		DN173010	
Total	10.50 ± 0.21 ^a	(100%) ^b	10.60 ± 0.36	(100%)	10.54 ± 0.24	(100%)
Total Anaerobes	10.49 ± 0.19	(100%)	10.60 ± 0.37	(100%)	10.53 ± 0.24	(100%)
Total Aerobes	8.88 ± 0.24	(100%)	8.48 ± 0.54	(100%)	8.42 ± 0.47	(100%)
Bacteroidaceae	9.91 ± 0.67	(100%)	9.66 ± 0.32 *	(100%)	9.61 ± 0.61	(100%)
<i>Bifidobacterium</i>	9.54 ± 0.55	(100%)	9.71 ± 0.53	(100%)	9.75 ± 0.75 * **	(100%)
<i>Eubacterium</i>	9.96 ± 0.81	(100%)	9.99 ± 0.73	(100%)	9.77 ± 0.77	(100%)
<i>Clostridium</i> lecithinase(-)	8.14 ± 0.24	(100%)	8.59 ± 1.08	(100%)	7.89 ± 1.11	(100%)
<i>Clostridium</i> lecithinase(+)	5.54 ± 1.03	(100%)	5.19 ± 0.49	(64%)	4.08 ± 0.54 * **	(36%)
<i>Lactobacillus</i>	6.38 ± 0.84	(100%)	6.22 ± 0.68 *	(86%)	5.81 ± 1.28	(100%)
<i>Streptococcus</i>	8.08 ± 0.44	(100%)	7.74 ± 1.08 *	(100%)	8.16 ± 0.35 *	(100%)
<i>Staphylococcus</i>	4.30 ± 0.49	(100%)	4.60 ± 0.95	(86%)	4.62 ± 1.17	(93%)
Enterobacteriaceae	8.27 ± 0.72	(100%)	7.83 ± 0.84	(100%)	7.54 ± 0.63	(100%)
<i>Bacillus</i>	8.50 ± 0.98	(100%)	8.18 ± 0.30	(100%)	8.07 ± 0.18	(100%)
Yeasts	3.57 ± 0.86	(100%)	3.44 ± 0.61	(71%)	3.37 ± 0.68	(57%)

a: Values represent Log₁₀ of bacteria count (cfu), mean ± SD.

b: Frequency of occurrence.

*Significantly different compared with Observation ($p < 0.05$).

**Significantly different compared with Control ($p < 0.05$).

II-2-3-4 糞便中の pH、水分、アンモニア量および SCFA 量

糞便の pH、水分、アンモニア量、SCFA 量の分析結果を Table 2-2-4 に示した。

pH には変化がなかった。

水分は、DN173010 ヨーグルト摂取期と対照ヨーグルト摂取期で観察期と比べて有意に減少した。

アンモニア量には変化がなかった。

SCFA 量は、DN173010 ヨーグルト摂取期と対照ヨーグルト摂取期で観察期と比べて有意に減少した。

Table 2-2-4 Effect on the intestinal environment in DN173010 efficacy study.

	Observation	Control	n=14 DN173010
pH	6.94 ± 0.78	7.35 ± 0.79	7.11 ± 0.78
Moisture (%)	72.02 ± 6.50	69.70 ± 6.46 *	70.15 ± 9.10 *
Ammonia (μg/g)	1690 ± 720	1230 ± 590	940 ± 290
Total SCFA (μg/g)	12450 ± 6570	6430 ± 3710 *	6060 ± 3350 *

Values represent mean ± SD.

*Significantly different compared with observation ($p < 0.05$).

II-2-4 考察

便秘症は糞便の腸での滞留時間が長くなる腸の不調である。その結果、腸内腐敗が起こり有害菌が増殖し、それらが産生する有害物質で様々な疾病のリスクが発生する²⁵⁾。便通の状態には個人差があり一般人において画一的に便秘を定義することは難しい。便秘は単に排便の頻度が少ないということではないが、一般的には排便が3日以上ない、あるいは週に3回以下しかないといった排便頻度に加え、排便の困難さ、残便感を指標に診断されている。排便頻度はこのように便秘症の診断にも用いられ、腸の調子を知る上で分かりやすい指標である。一方で、腸管通過時間は食物を経口摂取してから排便するまでの時間であり、腸の動きを直接的に示す指標としてヨーロッパで用いられている⁵²⁻⁵⁵⁾。しかし、これまでにこの両方の指標でプロバイオティクスの便通への影響を同時に評価した報告はない。

本節において、被験者全体と STT 群において、腸管通過時間が DN173010 ヨーグルト摂取期において観察期や対照ヨーグルト摂取期に比べて短縮したが、FTT 群では DN173010 ヨーグルト摂取による変化はなかった。これらのことから、DN173010 ヨーグルトは腸管通過時間の短縮に寄与し、特に STT 群で顕著であることが示唆された。これは Meance らの報告と同様であった⁵⁵⁾。排便頻度は、STT 群では DN173010 ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期に比較して増加したが、FTT 群では変化がなかった。排便量は FTT 群、STT 群ともに DN173010 ヨーグルト摂取期で観察期と比較して増加したが、STT 群の方がより増加した。このことから DN173010 の便通改善効果は腸管通過時間が長い場合に顕著に現れることが示唆された。

腸内細菌叢では DN173010 ヨーグルト摂取により *Bifidobacterium* 菌数が増加し占有率が上昇した。*Bifidobacterium* は腸内細菌叢の中でも宿主に有益な影響を持つ菌であることが知られている。プロバイオティクス摂取による排便頻度の増加と腸内 *Bifidobacterium* 菌数の増加と占有率の上昇を同時に観察した報告は多く存在し、*Bifidobacterium* は便通改善の主な因子だと考えられている^{9), 10), 14), 22), 42-44)}。一方で *Clostridium lecithinase* (+) が減少した。DN173010 の摂取で β -グルクロニダーゼ活性が低下するとの報告がある⁵⁶⁾。*Clostridium lecithinase* (+) は腐敗性細菌であり、腸内酵素活性のうち β -グルクロニダーゼ、ニトリダクターゼ、トリプトファナーゼ活性を増加させることが報告されていて⁵⁷⁾、大腸ガンへの関与が推測されている。大腸ガンのみならず、消化・吸収された後の食物残渣が腸内で腐敗することなく速やかに体外に排

泄されることは健康を維持する上で重要である。今後、便秘改善効果および腸内細菌叢改善効果のある DN173010 の摂取による腸内腐敗防止についてさらなる研究が期待される。また、DN173010 ヨーグルトの摂取により Bacteroidesae 占有率の減少も観察された。Bacteroidesae は日和見菌とされ、腸内細菌叢が悪化すると病原性を発揮することが知られている。また、Bacteroidesae の 1 菌種がアレルギーに関与することを示唆する報告もある⁴⁷⁾。これらのことから、DN173010 の摂取で腸内細菌叢が改善し、宿主の健康に良い影響を与えるものと推察された。DN173010 はヨーロッパにおいてすでに生きて腸に届くことが確認されているプロバイオティクスである⁵¹⁾。しかし本試験では DN173010 が腸へ生きて到達することは確認していない。本試験で確認された腸内細菌叢の改善と DN173010 が生きて腸に届くこととの関係解明が今後期待される。

DN173010 を含まない対照ヨーグルトの摂取でも STT 群において腸管通過時間短縮、排便頻度の増加、排便量の増加、Bacteroidesae 菌数の減少が観察された。対照ヨーグルトに含有される *S. thermophilus*、*L. lactis*、*L. bulgaricus* は胃酸、胆汁酸への耐性はないため、生菌としては腸に届かない。しかし、*S. thermophilus*、*L. bulgaricus* を含有したヨーグルトに整腸効果があるとの報告もあり¹¹⁾、本試験の対照ヨーグルトにも整腸効果があった。しかし、DN173010 ヨーグルトの方が腸管通過時間、排便頻度、排便量、腸内細菌叢への影響が強かったことから、本試験での整腸効果は DN173010 によることが示唆された。

Meance らは、イタリアにおいて 200 名の 50-70 歳の健常者を対象として DN173010 含有ヨーグルトに摂取量依存的な腸管通過時間短縮効果を見出し、1 日 125g の摂取で有効であると報告した⁵⁵⁾。本試験では健常な若年日本人女性でも 1 日に 170g のヨーグルト摂取で腸管通過時間の短縮を観察した。このことから、DN173010 の腸管通過時間短縮効果は、人種、および年齢に関係なく観察されることが示唆された。

DN173010 以外のいくつかのプロバイオティクス摂取試験において、*Bifidobacterium* 菌数の増加や占有率の上昇などの腸内細菌叢改善と同時に排便頻度が低い集団で排便頻度の増加が確認されている^{9), 10), 14), 15), 42), 44)}。しかし、腸内細菌叢の改善と排便頻度の増加との関連性は十分に明らかにされていなかった。本試験では、DN173010 の摂取により *Bifidobacterium* 菌数の増加と占有率の上昇などの腸内細菌叢の改善、腸管通過時間短縮および排便頻度の増加が同時に観察された。このことから、腸内細菌叢の改善により腸管通過時間が短縮し、その結果排便頻度および排便量が増加したと推測された。ただし、腸内細菌叢の改善

がどのように腸管通過時間の短縮に関係するのかは本試験からは明らかでない。腸内細菌が産生する SCFA が腸上皮細胞のエネルギー源になり腸の蠕動運動を亢進するという報告があるが³⁵⁾、本試験では糞便の SCFA の増加は観察されなかった。腸内で産生された SCFA は速やかに腸上皮細胞へ吸収されるため、SCFA の糞便残留量の測定だけでは腸内での SCFA の代謝を正確に把握することはできないとの指摘がある。また、糞便 pH の低下や水分の増加も便通を促進すると考えられているが、本試験では水分は減少し、pH は変化がなかった。これらの指標はプロバイオティクスの摂取による整腸効果の末端の指標であり、作用機序の途中で未知の要因が介在し仮説のとおりの変現をしなかったとも考えられる。

今後、便通の状態を観察する方法や腸内細菌叢および腸内 pH、水分、SCFA 量の測定については腸内から直接サンプル採取するとかサンプル採取から分析するまでの時間を短縮するような検討を行い、腸内細菌叢の視点からのプロバイオティクスによる整腸効果のメカニズムを解明することが望まれる。

II-2-5 結論

本節において、DN173010 の総合的な整腸効果を評価するために、健常な日本人女性を対象として無作為化二重盲検対照比較クロスオーバー試験(RCT)を実施した。DN173010ヨーグルトを1日に170g、14日間摂取することで、腸管通過時間の短縮、排便頻度の増加、排便量の増加および腸内細菌叢の改善が観察され、特に腸管通過時間が40時間以上の被験者では腸管通過時間の短縮と排便頻度の増加が同時に観察された。結論として、DN173010には整腸効果があり、腸管通過時間が長い場合に顕著であることが明らかとなった。

第Ⅲ章 *Lactobacillus paracasei* KW3110 のプロバイオティクス活性と

整腸効果の評価

Ⅲ-1 緒言

プロバイオティクスは、Salminen らにより「宿主の健康状態に有益な影響を及ぼす生菌が含まれている食品」と定義され⁵⁸⁾、その後国際連合の食料農業機関および世界保健機関共同のワーキンググループにより「適正量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体」と再定義された。他方、プレバイオティクスは、「大腸にいる特定の細菌の増殖および活性に選択的に影響を及ぼすことにより、宿主動物に有益な影響を及ぼし、宿主の健康状態を改善する消化されない食品成分」と定義されている⁵⁹⁾。いずれも作用機序が腸内細菌叢の改善であり、宿主の健康によい影響をもたらすことが出来る。

第Ⅱ章で、*Bifidobacterium lactis* の 2 株 (BB-12、DN173010) の腸内細菌叢や便性の改善といった整腸効果の観点で宿主への健康影響を明らかにし、プロバイオティクスとしての活性を持つことを示した。これらの 2 株は、その他に腸内細菌叢のバランスの改善効果^{42), 44), 60)}、下痢⁶¹⁾ や便秘^{44), 62)} などの便通障害の改善効果、感染性疾患の予防効果⁴⁵⁾ や炎症性腸疾患の改善効果^{62), 63)} があることも報告されている。

プロバイオティクスの主な作用機序が前述のように腸内細菌叢の状態を改善することであるのに対し、菌自体、又は菌により生産される物質が宿主に直接影響を及ぼすことは「バイオジェニクス」と定義されている。代表的なバイオジェニクスは、*Lactobacillus helveticus* のジペプチド誘導体であり、これには高血圧改善効果がある⁴⁹⁾。最近の報告において、バイオジェニクスは、抗アレルギー効果や免疫刺激効果などの免疫修飾効果^{46), 64)}、生活習慣病に分類される高血圧症や高脂血症に及ぼす改善効果^{65), 66)} および抗腫瘍効果⁶⁷⁾ のような消化器以外の種々の疾患を改善することが示されている。

KW3110 は、バイオジェニクス活性を有することが明らかにされた菌株である⁶⁸⁾。マウス脾細胞の *in vitro* 培養における Th1/Th2 バランスの Th2 分極反応抑制作用を用いた乳酸菌の抗アレルギー活性のスクリーニングを行い、乳酸菌の抗アレルギー活性は菌種ではなく菌株によって異なること、さらに KW3110 は 100 を超える菌株の中で最も有効であることが示された。KW3110 菌体を卵白アルブミンに感作させた

BALB/c マウスに経口投与すると、KW3110 の菌体を投与されていない対照マウスと比較して、脾臓細胞からの、Th1 細胞パラメータとして IL-12 分泌の誘導と、Th2 パラメータとして IL-4 分泌の抑制、および血清 IgE 上昇の抑制を示した⁶⁸⁾。さらに、スギ花粉に対するアレルギー症状のある患者に KW3110 を投与すると、Th1/Th2 バランスが改善し、ECP 上昇が抑制された⁶⁹⁾。さらに、塩化ピクリルを NC/Ng マウスの皮膚に塗布することにより誘発したアトピー性皮膚炎モデル動物において、KW3110 の経口摂取により、皮膚炎の症状および IgE の産生が抑制されることが示された⁷⁰⁾。これらの試験は KW3110 の加熱処理菌体を用いているため、この菌株の細胞成分はバイオジェニックスとして直接宿主に作用することが示唆された。

他方、いくつかの報告により、アレルギー性反応における腸内細菌叢の関与が示唆されている。Björksténらは、アレルギーを有する小児の腸内細菌叢の状態は、健康な小児とは異なると報告している⁶⁴⁾。Wickensらは、小児に抗生物質を用いることは、後にアレルギー性疾患を発症する危険因子であることを示唆し、アレルギー性疾患は抗生物質の使用が原因で腸内細菌叢の状態が変化したことにより生じたと推測している⁷¹⁾。合わせて考えると、腸内細菌叢はアレルギーと関連しているため、腸内細菌叢の状態を改善することができるプロバイオティクスは、アレルギーを緩和する効果があることが示唆される。さらに、プロバイオティクスは炎症性腸疾患や下痢により生じる腸上皮細胞のアポトーシスを抑制したが、死菌体にはこのような抑制効果はなかったことが報告されている⁷²⁾。KW3110 がプロバイオティクスとしての活性を有しているのならば、この菌株はバイオジェニックスとしてだけでなく、腸内細菌叢の状態を改善することによっても抗アレルギー活性を発揮することが期待される。

このように、プロバイオティクスとバイオジェニックスとは異なる概念であるが、生理学的な影響について共通性も高いのではと関心が持たれている。しかしこれまでこのことを明らかにする研究はなされてこなかった。

本章では、*Bifidobacterium lactis* の 2 株とは異なる属で、バイオジェニックスとして既に開発された KW3110 に、耐酸性、耐胆汁性、腸上皮細胞への接着性といったプロバイオティクスの活性があるかどうかを *in vitro* で検証した。また、大腸へ生きて届くかどうか、消化管内での滞留性はどうか、さらには腸内細菌叢や排便状況を改善するといった整腸効果があるかをヒトで検証するため、KW3110 ヨーグルト経口摂取試験を実施した。

KW ヨーグルト摂取量の条件を、通常摂取レベルの 100g/日に極少量の 10g/日を加え、摂取量依存性の観点からも評価した。

Ⅲ-2 材料と方法

Ⅲ-2-1 菌株

Lactobacillus paracasei 20 株および *L. acidophilus* 7 株、*L. jonsonii* 4 株、*L. gaserri* 3 株、並びに *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*L. casei*、*L. brevis*、*L. helveticus*、*L. hilgardii*、*L. plantarum*、*Leuconostoc mesenteroides*、および *Streptococcus thermophilus* の各 1 株を、キリンホールディングス株式会社フロンティア技術研究所のコレクションから採取した。これらの乳酸菌は de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 培地 (Oxoid) で、30°C 又は 37°C で増殖させた。

Ⅲ-2-2 KW3110 の酸耐性

KW3110 を 600 nm での光学密度 (OD_{600}) を測定することにより対数期まで増殖させ ($OD_{600}=0.5\sim 1.0$) た後、遠心分離 (7000rpm、5 分、4°C) により採取した。採取した生菌体は PBS (pH 6.5) で $OD_{600}=0.5$ に調整した。生菌体懸濁液を HCl で pH3.0 に調整した酸性 MRS 培地で 10 倍に希釈し、37°C で 3 時間インキュベートした。その後、48 時間インキュベートした後の MRS 寒天培地 (pH6.2) 上の生菌数を測定し酸に対する耐性の指標とした。

Ⅲ-2-3 KW3110 の胆汁酸耐性

KW3110 を一晩 MRS 培地中で増殖させ、次に 10^6 cells/ml を 2.0%胆汁酸塩を含有する新たな MRS 培地 (Oxoid No. L55、Oxoid、pH6.2) に接種し 24 時間培養し、Biplotter (Oriental Instrument) を用いて 630 nm での光学密度 (OD_{630}) を 1 時間毎に測定することにより増殖度合を観察した。最終 OD_{630} を測定し胆汁酸に対する耐性の指標とした。

Ⅲ-2-4 KW3110 の腸上皮細胞への接着性

ヒト結腸ガン由来株化細胞 Caco-2 細胞株を次のとおりに培養した⁷³⁾。細胞を 6 穴プレート上に 1.4×10^4 細胞/cm² で播種し、20%非働化ウシ胎児血清および 1%非必須アミノ酸を添加したダルベッコ変法イーグル

培地(DMEM、25 mM グルコース)で培養した。細胞は、37°C、10%CO₂-90%空気中で保持した。

また HT29 の培養方法は、10%非働化ウシ胎児血清を添加した以外は Caco-2 と同様とした。

乳酸菌の Caco-2 への接着性の測定は、次のように行った。前記で培養した Caco-2 を DMEM 培地で 3 回洗浄した。乳酸菌の菌種と菌株数は、*L. acidophilus* を 8 株、*L. gasseri* を 9 株、*L. johnsonii* を 6 株、*L. paracasei* を Caco-2 に対し 19 株、HT29 に対し 8 株を用いた。各乳酸菌を 48 時間培養後、PBS(Ca を含まない)で洗浄し、OD₆₀₀=0.7 の濃度となるように同じ緩衝液に懸濁した。この懸濁液(2 ml)を、Caco-2 を培養した 6 穴プレートの各穴に加え、プレートを 37°C、10%CO₂-90%空気中で 1 時間インキュベートした後 3 回 DMEM 培地で洗浄し、メタノールで 4°C、30 分固定した後、グラム染色した。顕微鏡の 4 つの異なる視野で接着菌数を数えた。

Ⅲ-2-5 ヒトにおける KW3110 ヨーグルト経口摂取試験

KW3110 のプロバイオティクス活性をヒトで確認するために、KW3110 で調製したヨーグルトを用いて KW3110 ヨーグルト経口摂取試験を実施した。

Ⅲ-2-5-1 試験食品

Table 3-1 に、試験食品(KW3110 ヨーグルト)の組成を示した。KW3110 ヨーグルトは KW3110 で発酵させ、KW3110 を 4×10^8 cfu/g 以上とした。

Energy	90 kcal
Protein	3.5 g
Lipids	3.1 g
Carbohydrates	12.2 g
Na	51 mg
KW3110	4.0×10^{10} cfu *

*cfu: Colony forming unit

Ⅲ-2-5-2 被験者

9名の健常被験者(男性2名、女性7名、平均年齢27.1±6.8歳、平均BMI:21.6±1.9)で本試験を行った。選択基準は、処方箋薬を投与中ではなく、乳製品に不耐性、重度の便秘、および下痢を示すことなく、健康であることとした。ヘルシンキ宣言に従い、またキリンビール株式会社の倫理委員会および昭和女子大学の倫理委員会の承認を得た。

Ⅲ-2-5-3 試験デザイン

試験デザインを Fig. 3-1 に示す。総試験期間は28日で、試験期間中他の発酵乳および乳酸菌飲料、オリゴ糖、および食物繊維の摂取を禁止した。1週間の観察期間後(-7日目~-1日目)、1日100gのKW3110ヨーグルトを1週間摂取した(100g摂取期、0日目~6日目)。次に、KW3110ヨーグルトの摂取を1週間中止し(休止期、7日目~13日目)、その後さらに1週間毎日10gのKW3110ヨーグルト摂取した(10g摂取期、14日目~20日目)。

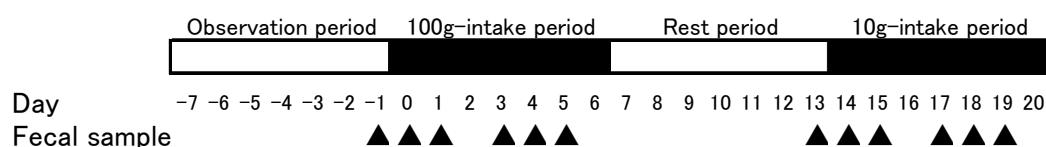


Fig. 3-1 Schedule of KW3110 yogurt oral-administration study. Each period is indicated by a rectangle. Filled triangles indicate the day of sampling of feces.

Ⅲ-2-5-4 試験中の生活および便性の調査

被験者の試験中の生活および便性の調査をするために、1日の食事、排便の回数および量、医薬品の必要性、および一般健康状態に関する1日ごとのアンケートを実施した。全ての被験者は、試験前後に医師による問診を受けた。試験スケジュールを終了できなかった被験者はおらず、試験期間中、腹部および全身の健康に有害な作用はみられなかった。

Ⅲ-2-5-5 培養法による腸内細菌叢の検索

全ての被験者について1日1回便検体の採取を行った(排便があった場合)。便検体はアネロパック(三菱ガス化学株)を用いて、4°Cで嫌氣的に保存し、既報の方法⁷⁴⁾を元に次の変更を加え分析した。

便検体は、十分に混合し、0.09%寒天を添加した滅菌生理食塩水に懸濁した。検体は、同液を用いて段階的に希釈し、平板培地に塗布し培養した。総嫌気性菌にはEG寒天培地およびBL寒天培地を用いた。総好気性菌にはTS寒天培地、*Bifidobacterium*にはTOS-プロピオン酸寒天培地、および*Lactobacillus*にはLBS寒天培地を用いた。37°Cで48時間培養後にコロニーを数え、コロニー形成単位(cfu)の常用対数を用いて菌数を表した。総菌数は、総嫌気性菌数と総好気性菌数の合計として示した。*Bifidobacterium*の占有率は総菌数に対する比率とした。LBS寒天培地のコロニーが*L. paracasei*であるかどうかは、最初にコロニーの形態を判定し、次に16S rRNA遺伝子配列決定により確認した。

Ⅲ-2-5-6 Qt-PCR法による腸内細菌叢の検索

便検体を2mlの抽出緩衝液(100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 9.0)に懸濁した。DNA抽出は、Fast DNA SPIN Kit for soil(Qbiogen)を用いて、マニュアルに従って実施した。抽出したDNAを抽出緩衝液で3回洗浄した。精製したDNAサンプルをその後定量PCR分析(Qt-PCR)にかけ、Light Cycler(Roche Diagnostics)を用いて菌数を求めた。16S rRNA遺伝子の増幅は、各プライマー0.2 μMと0.1 μg/μl BSAを含有するSYBR Premix Ex Taq™(タカラ)を用いて実施した。

*Bifidobacterium*の定量においては、プライマーとしてg-Bifid-F: 5'-CTCCTGGAAACGGGTGG-3' およびg-Bifid-R: 5'-GGTGTTCCTCCGAATCTAA-3'⁷⁵⁾を用い、*Bifidobacterium longum* JCM1217を標準株として用いた。*Lactobacillus*の定量においては、プライマーとしてLacto F: 5'-TGGAAACAG

RTGCTAATACCG-3'および LactoR:5'-CCATTGTGGAAGATTCCC-3'⁷⁶⁾を用い、*L. gasseri* JCM1131を標準株として用いた。*L. paracasei*の定量においては、プライマーとして PARA : 5'-CACCGAGATTCAACATGG-3'および Y2:5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'⁷⁷⁾を用い、KW3110を標準株として用いた。標準株は、安定期まで培養した。菌はPBSで2回洗浄した。菌体をDAPIで染色して、顕微鏡で観察することにより菌数を求めた。標準株の希釈シリーズから抽出したDNAを、便検体中の菌数の定量に用いた。

KW3110菌数の定量においては、KW3110の培養液の菌数を顕微鏡で観察し、その数を基に菌数の分かっている希釈液系列を作成しQt-PCR測定して検量線を作成した。便検体の段階希釈液をQt-PCRで分析しこの検量線より菌数を判定した。KW3110経口摂取試験において、観察期では*L. paracasei*の濃度は低かったため、増加分は全てKW3110とした。

Ⅲ-2-5-7 統計処理方法

総菌数、総嫌気性菌数、総好気性菌数、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*L. paracasei*、排便回数、および排便量について統計解析を行った。100 g 摂取期および 10 g 摂取期中の全データを、Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank 検定を用いて、それぞれ観察期(-1日目)および休止期(13日目)と比較した。全ての検定について、危険率(p)が0.05未満の場合を有意差があると判断した。

Ⅲ-3 結果

Ⅲ-3-1 KW3110 の酸耐性および胆汁酸耐性

KW3110 のプロバイオティクス活性を評価する *in vitro* 試験を実施した。プロバイオティクス活性に関する *in vitro* 試験については、過去に報告がある⁷⁸⁻⁸⁰⁾。Fig. 3-2 に、KW3110 と乳酸菌 13 種類の菌株の酸耐性試験の結果を示した。3 時間の酸処理後でも、*L.paracasei* を含む 3 菌株が 85% 以上の生存を示した。KW3110 は、高い生存性を示した (約 70%)。対照的に、通常乳製品の製造に用いられる *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* および *Streptococcus thermophilus* は、3 時間後の生存は 0.01% 未満であった。

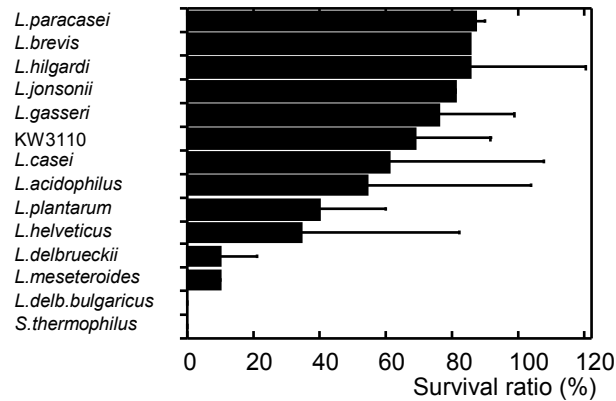


Fig. 3-2 Acid tolerance of type strain of lactic acid bacteria and KW3110.

Fig. 3-3にKW3110、さらに *L. paracasei* 16 株、*L. acidophilus* 7 株、*L. jonsonii* 4 株、*L. gasseri* 3 株の 2.0%胆汁酸に対する耐性を示した。今回の試験でテストした *L. paracasei* 17 菌株のうち、13 株は胆汁酸存在下で 24 時間培養中に増殖することができ ($OD_{630} > 0.1$)、6 株は *L. gasseri*、*L. jonsonii* および *L. acidophilus* などの腸内常在菌と等しいか、よりすぐれた胆汁酸耐性を示した。胆汁酸耐性乳酸菌のうち、KW3110 は胆汁酸に対し最も強い耐性を示すもののひとつであった。このことは、この株が胆汁酸が存在する腸内で増殖できることを示唆している。

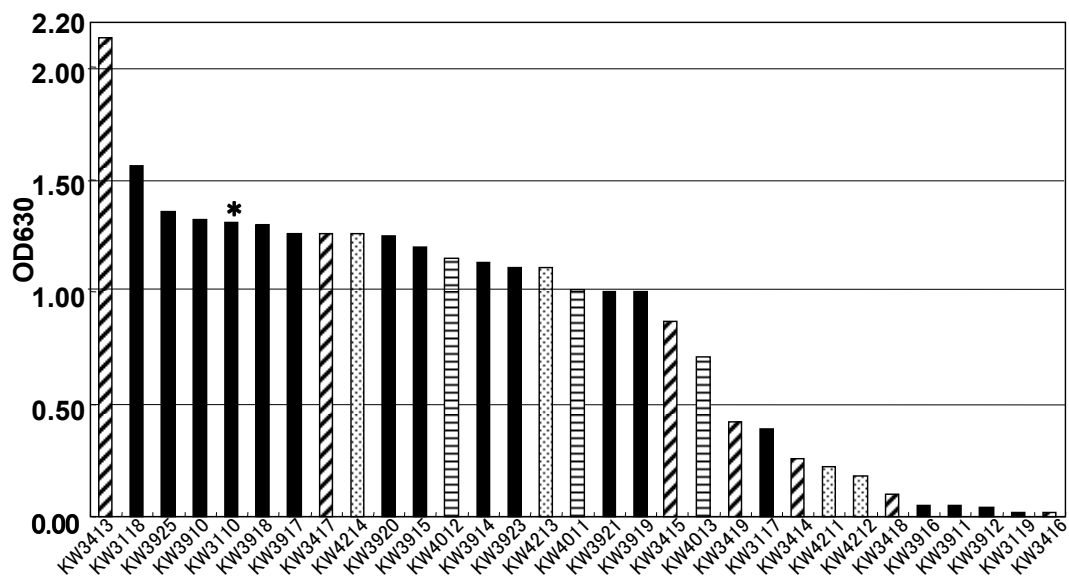


Fig. 3-3 Bile tolerance of lactic acid bacteria. Seventeen *L. paracasei* strains (solid columns), 7 *L. acidophilus* strains (hatched columns), 4 *L. jonsonii* strains (dotted columns), and 3 *L. gasseri* strains (horizontal lined) were subjected to the bile tolerance test. Cells were cultured in MRS medium containing 2.0% oxygall (Oxoid). The tolerance was determined by measuring OD_{630} after 24 h cultivation.
*KW3110.

Ⅲ-3-2 KW3110 の腸上皮細胞への接着性

Table 3-2 に KW3110、*L. acidophilus*、*L. gasseri*、*L. jonsonii*、および *L. paracasei* の Caco-2 および HT29 への *in vitro* 接着性試験の結果を示した。*L. acidophilus*、*L. gasseri*、および *L. jonsonii* などの腸管常在乳酸菌の Caco-2 への平均接着性が、*L. paracasei* よりも高いことを示した。しかし、同じ種の菌株の間で大きなばらつきがみられた。KW3110(193 個/50Caco-2 細胞)は、試験した *L. paracasei* の他の 8 株(15±10 個/50Caco-2 細胞)よりもひとときわ高い接着性を示したため、KW3110 と *L. paracasei* の他の 8 株の接着性を比較するための HT29 を用いた追加の実験を実施した。この場合も、KW3110 は(208 個/50 HT29 細胞)、試験した他の *L. paracasei* 株(57±35 個/50 HT29 細胞)よりも高い接着活性を示した。これらの結果より、KW3110 は、他の *L. paracasei* 株よりも腸上皮細胞に接着し、長い期間滞留することができると思われた。

Table 3-2 Adhesion properties of *Lactobacilli* to Caco-2 and HT29.

Strains	Adhesion properties ^a	Max ^a	Min ^a
<i>L. acidophilus</i>	564±728 [*]	1,868	36
<i>L. gasseri</i>	590±271	1,138	229
<i>L. jonsonii</i>	274±163	430	128
<i>L. paracasei</i>	15±10	39	3
<i>L. paracasei</i>	57±35 ^b	125	19
KW3110	193		
KW3110	208 ^b		

*Mean±SD.

a: Number of adhering *Lactobacilli* to 50 epithelial cells.

b: Adhesion property to HT29 cells.

Ⅲ-3-3 ヒトでの KW3110 ヨーグルト経口摂取試験

KW3110の酸耐性、胆汁酸耐性および腸上皮細胞への接着性試験の結果、KW3110は上部消化管を通過し下部消化管に達することが示唆され、また Caco-2 への接着性が、試験した他の *L. paracasei* 株よりも高いことも示された。これらの結果を確認するために、KW3110ヨーグルトのヒトへの経口摂取試験を Fig. 3-1 に示した計画に従って実施した。Table 3-3 に培養法により測定した被験者の便検体中の *L. paracasei* 菌数を示した。Fig. 3-4 に、Qt-PCR 法により測定した各被験者の KW3110 菌数を示した。培養法は被験者 9 例全員に適用し、Qt-PCR 法は 6 例に適用した。

KW3110 投与前日(-1 日目)に、被験者 9 例中 1 例のみで *L. paracasei* が検出されたが、濃度は非常に低かった($10^{2.6}$ cfu/g 便)。 *L. paracasei* が培養法では検出されなかった 6 例は、さらに Qt-PCR 法で検査したが検出限界未満であった($<10^3$ 個/g 便)。

KW3110 ヨーグルト 100 g の摂取を開始すると、*L. paracasei* は、投与初日に早くも 9 例中 7 例の便中から検出されるようになった。100 g 摂取期中、*L. paracasei* の濃度は非常に高いままであった(培養法および Qt-PCR 法において、それぞれ $10^{4.6\sim 6.7}$ cfu/g 便および $10^{8.0\sim 9.1}$ 個 /g 便)。

6 日間の 100 g 摂取期の後、摂取した KW3110 を排出するために、ヨーグルトの摂取を止めた(休止期)。休止期の終わり(13 日目)に、培養法および Qt-PCR 法により *L. paracasei* の残留数を求めた。培養法により、*L. paracasei* は 9 例中 8 例で 10^3 cfu/g 便未満に排出されているのに対し、1 例では $10^{3.1}$ cfu/g 便検出された(データは示していない)。この結果は、Qt-PCR 法によっても支持された。*L. paracasei* は、被験者 6 名中 3 名で Day13 において検出限界未満まで排出されたのに対し、残りの 3 名はでまだ $10^{4.4\sim 5.3}$ 個/g 便が検出された(Fig. 3-4)。これらの結果は、KW3110 は、ヒト腸において 1 週間安定して滞留することができることを示唆している。

KW3110 ヨーグルト 10 g の投与を再開すると、濃度のばらつきは個人間で非常に大きかったものの($10^{4.0\sim 7.7}$ cfu/g 便)、*L. paracasei* は 9 例中 8 例で検出された。Qt-PCR 法によると、10 g 摂取期中に、 $10^{6.5\sim 8.7}$ 個/g 便の *L. paracasei* が被験者 6 例全員で検出された。被験者 3 番と 6 番の KW3110 の数は、他の被験者の 10 分の 1 未満であった。腸における KW3110 の数は、宿主側の要因と摂取量に依存的であると考えられる。

Table 3-3 Effect of KW3110 yogurt on the intestinal microbiota in KW3110 yogurt oral-administration study.

Day	-1	0	1	3	4	5
		← 100g-intake →				
Total	10.49 ± 0.24 *	10.52 ± 0.24	10.67 ± 0.13	10.67 ± 0.22	10.49 ± 0.26	10.47 ± 0.39
Total Anaerobes	10.48 ± 0.24	10.52 ± 0.24	10.67 ± 0.13	10.67 ± 0.22	10.48 ± 0.26	10.46 ± 0.39
Total Aerobes	7.71 ± 0.80	7.96 ± 0.68	4.81 ± 5.39	7.65 ± 0.93	5.95 ± 3.15	7.62 ± 0.58
<i>Bifidobacterium</i>	9.81 ± 0.31	9.82 ± 0.36	10.28 ± 0.09	10.06 ± 0.26 ^a	9.88 ± 0.36	9.90 ± 0.52 ^a
<i>Lactobacillus</i>	4.83 ± 1.44	6.44 ± 1.32 ^a	6.80 ± 0.28	6.74 ± 1.11 ^a	6.57 ± 0.89 ^a	6.62 ± 0.92 ^a
<i>L. paracasei</i>	0.29 ± 0.87	4.63 ± 3.50	3.96 ± 3.74	6.74 ± 1.11	6.00 ± 2.45	6.46 ± 1.37

Day	13	14	15	17	18	19
		← 10g-intake →				
Total	10.53 ± 0.25	10.63 ± 0.29	10.68 ± 0.21	10.62 ± 0.32	10.44 ± 0.32	10.50 ± 0.25
Total Anaerobes	10.52 ± 0.25	10.58 ± 0.31	10.67 ± 0.22	10.60 ± 0.35	10.47 ± 0.29	10.49 ± 0.25
Total Aerobes	8.26 ± 0.73	8.07 ± 0.61	7.88 ± 0.88	8.07 ± 0.71	7.88 ± 1.00	7.91 ± 1.03
<i>Bifidobacterium</i>	9.80 ± 0.37	9.86 ± 0.36	10.11 ± 0.23	9.93 ± 0.51	9.90 ± 0.24	9.93 ± 0.11
<i>Lactobacillus</i>	4.09 ± 0.99	5.33 ± 1.08 ^a	5.63 ± 1.13	5.84 ± 1.85 ^b	6.10 ± 1.16 ^b	5.42 ± 0.68
<i>L. paracasei</i>	0.34 ± 0.38	1.07 ± 1.19	3.36 ± 3.84	3.11 ± 2.68	3.78 ± 4.20 ^b	3.55 ± 4.14

* Log₁₀ of bacteria count (cfu/g feces), mean ± SD.

a: Significantly different compared with Day-1 ($p < 0.05$).

b: Significantly different compared with Day13 ($p < 0.05$).

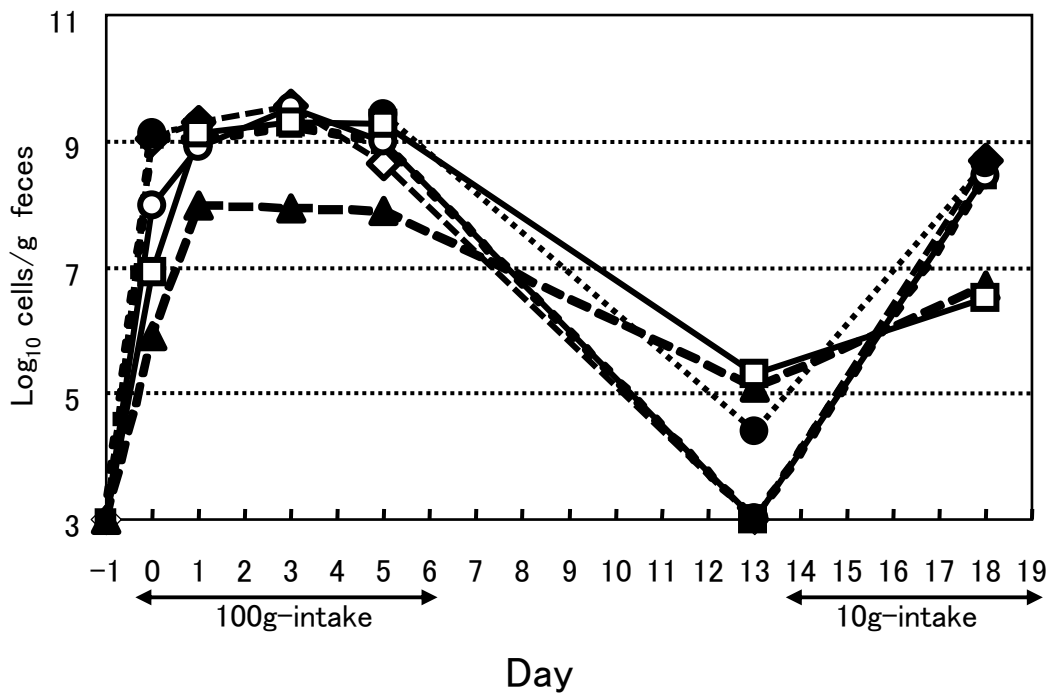


Fig. 3-4 Enumeration of KW3110 in fecal samples during the oral-administration test period in KW3110 yogurt oral-administration study. Fecal samples from 6 subjects were subjected to Qt-PCR to determine the number of cells of KW3110. Subject 1: open diamonds, subject 2: filled squares, subject 3: filled triangles, subject 4: open circles, subject 5: filled circles, subject 6: open squares. The detection limit of the Qt-PCR method was 3.0 \log_{10} cells/g feces.

Ⅲ-3-4 KW3110 ヨーグルト摂取による腸内細菌叢への影響

Table3-3 に、培養法での総菌数、総嫌気性菌数、総好気性菌数、*Bifidobacterium* 菌数、および *Lactobacillus* 菌数を示した。Fig. 3-5に、*Bifidobacterium* 菌数および *Lactobacillus* 菌数の経時変化を示した。これは培養法および Qt-PCR 法により求めた。試験期間全体にわたり、総菌数、総嫌気性菌数および総好気性菌数に大きな変化はなかった。

培養法により、投与前(-1日目および13日目)の *Bifidobacterium* 菌数は、 $10^{9.8}$ cfu/g 便であることが示された。これは 100 g 摂取期中に(0日目~5日目) $10^{9.9}$ cfu/g 便に上昇した。100 g 摂取期の3日目又は5日目と、-1日目との間に *Bifidobacterium* 菌数に有意差がみられた。*Bifidobacterium* 菌数は 10 g 摂取期中も $10^{9.9}$ cfu/g 便 に増加した(14日目~19日目)。しかし、この期間中に有意差はみられなかった。総菌数に対する *Bifidobacterium* 占有率は、Day -1: 20.9% Day 0: 20.0% Day 2: 40.7% Day 3: 24.5% Day 4: 24.5% Day 5: 26.9% Day 13: 18.6% Day 15: 17.0% Day 16: 26.9% Day 17: 20.4% Day 18: 28.8% Day 19: 26.9% となった。100g 摂取期と 10g 摂取期を比較すると、100g 摂取期の方が 10g 摂取期より *Bifidobacterium* 占有率が短期間で変化しかつ増加量も大きかった。

Qt-PCR 法で得られた結果は、培養法で得られたものとほぼ同じであった(Fig. 3-5 A)。

Lactobacillus 菌数は、培養法で KW3110 ヨーグルトの摂取により大きく増加することが示された。これは-1日目が $10^{4.8}$ cfu/g 便であり、100 g 摂取期中に約 $10^{6.6}$ cfu/g 便に上昇したことによる。統計解析により、100 g 摂取期の0日目、3日目、4日目、および5日目の *Lactobacillus* 菌数は、-1日目とは有意差があることが示された。次に、休止期中に $10^{4.1}$ cfu/g 便に低下した後、続く10g 摂取期中に約 $10^{5.4}$ cfu/g 便まで再度増加した。さらに、14日目、17日目、18日目の *Lactobacillus* 菌数は、13日目と比較して有意に増加した。これらの結果は、Qt-PCR 法によっても支持された。*Lactobacillus* の有意な増加が 100 g 摂取期の0日目、3日目、および5日目と、10g 摂取期の18日目に認められた(Fig. 3-5 B)。試験期間全体にわたり、Qt-PCR による測定値の方が培養法による測定値よりもはるかに高かった。この2つの方法の結果の間の最も大きな差は、-1日目および13日目(>1000倍)に観察され、KW3110 ヨーグルト摂取期中の差は小さかった(ほぼ10倍)。

これらのデータは、-1日目および13日目に Qt-PCRにより検出された多くの *Lactobacillus* は、酸性 LBS 寒天培地 (pH 5.5) にコロニーを形成することができなかったことを示していた。*Lactobacillus* の多くは、損傷を受けたあるいは腸内で死滅し、酸性 LBS 寒天培地 (pH 5.5) 上でコロニーを形成することができなかったと思われる。いくつかの報告により、細胞膜-ATP アーゼ活性は、細菌にとって酸性条件下での生存に重要であり、一部の化学的処理により容易に失活することが示されており⁸¹⁾、このデータは、損傷を受けていない腸内 *Lactobacillus* が KW3110 ヨーグルト 10g の摂取により有意に増加することを強く示唆していた。

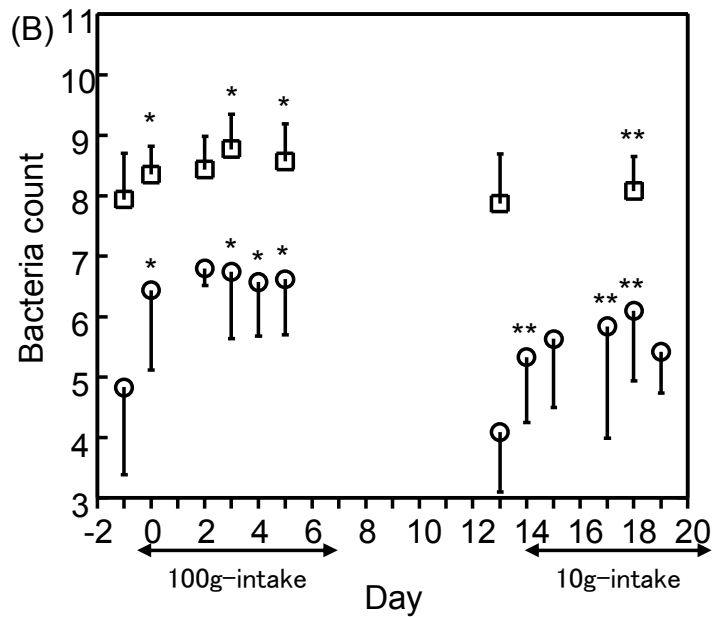
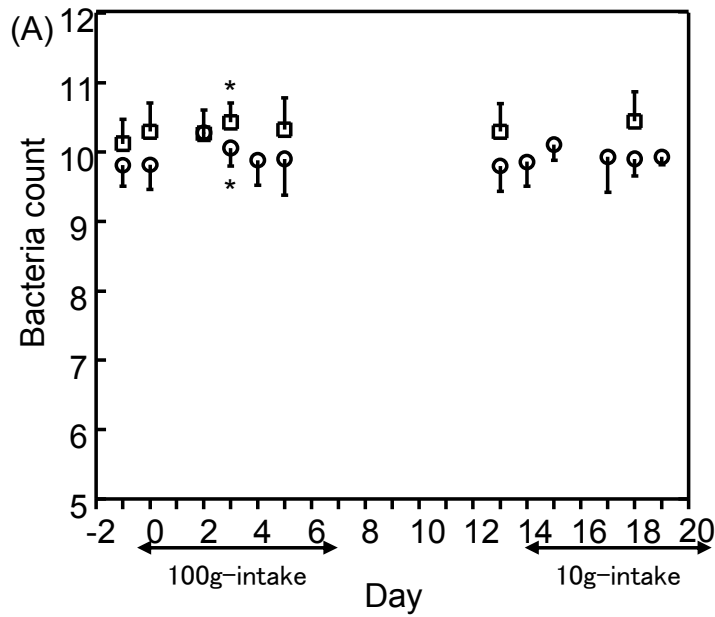


Fig. 3-5 Enumeration of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in fecal samples during the oral-administration test period in KW3110 yogurt oral-administration study.

(A) Enumeration of *Bifidobacterium*. (B) Enumeration of *Lactobacillus*. Open circles indicate the data obtained by the cultivation method from 9 subjects (log₁₀ cfu/g feces). Open rectangles indicate the data obtained by the Qt-PCR method from 6 subjects (log₁₀ cells/g feces).

The detection limit was 3.0 log₁₀ cfu/g feces in cultivation method, and was 3.0 log₁₀ cells/g feces in Qt-PCR method.

Data represent mean ± SD.

*p < 0.05 compared with Day -1.

**p < 0.05 compared with Day 13.

Ⅲ-4 考察

本試験により、KW3110 は腸内細菌叢を改善し整腸効果を有するプロバイオティクスであることが判明した。*in vitro* 試験の結果、KW3110 は酸に耐性であり、胆汁酸存在下で増殖することができることが示された。ヒトを対象とした *in vivo* 試験により、KW3110 は、上部消化管において胃液に耐性であり、下部消化管に生きてままた到達することが強く示唆された。培養法により測定した生きた *Bifidobacterium* および *Lactobacillus* 菌数は、KW3110 ヨーグルト摂取後、有意に増加した。*Bifidobacterium* 占有率も同様の傾向であった。便からの KW3110 の検出量および腸内細菌叢の改善効果で摂取量依存性も観察された。さらに、アンケートから排便頻度および排便量に、有意ではないが増加する傾向が認められた(データは示していない)。合わせて考えると、乳酸菌の他の株での試験^{83), 84)}でも報告されているように、KW3110 ヨーグルトの摂取は、*Bifidobacterium* および *Lactobacillus* の菌数増加、*Bifidobacterium* 占有率の上昇により便通を改善するとと思われる。便性の改善についても KW3110 ヨーグルトの摂取で改善する可能性がある。今後、排便等の改善に必要な最低摂取量の見極め、さらには RCT を用いて客観性・信頼性を高めた試験方法で検証することが必要である。

KW3110 は、*L. paracasei* の菌株として、Caco-2 および HT29 への接着活性が高いことが示されたことは非常に興味深い。既報の細菌の腸管への接着に関する多くの *in vitro* での報告において、いくつかの細菌細胞表面タンパク質、たとえば *L. reuteri* の MapA⁸⁵⁾、*L. crispatus* の CbsA⁸⁶⁾ および *L. jonsonii* の EF-Tu⁸⁷⁾ が腸管への接着に関与する重要な要因として発見されている。*L. casei* ATCC334 株の遺伝子配列には、EF-Tu 因子の配列が含まれている。また、細胞表面関連リポテイコ酸(LTA)が、*L. jonsonii* の Caco-2 への接着特性の決定因子であることが別の報告で立証されている⁸⁸⁾。マイクロアレイおよび/またはこれらの遺伝子の欠失変異株を用いたさらなる試験により、KW3110 の腸管への接着特性が、EF-Tu などのタンパク質因子により、または LTA により媒介されているか否かが解明されるであろう。

ヒトを対象とした試験において、KW3110 ヨーグルトは摂取を止めた 1 週間後でも腸管内に留まることが示された。(Fig. 3-4)。さらに、KW3110 菌体のラットへの経口投与試験において、この菌株が経口投与中止後も *L. paracasei* の他の菌株よりも長く腸管に留まっていることを確認している(データは示していない)。

Schultz は、*L. rhamnosus* GG 株を妊婦に経口投与後、この株が 1 週間以内に母親の便から消失したのに対し、乳児に投与した場合は数ヵ月安定して間留まっていることが観察されたと報告している⁸⁹⁾。KW3110 は、*L. rhamnosus* GG 株と同等か、より長く腸内に留まることができると思われる。抗アレルギー効果のメカニズムについてさらに多くの研究が必要であるが、ヒト腸における KW3110 のこの良好な定着性は、この菌株の *in vivo* における抗アレルギー効果に良い影響を及ぼすものと思われる。*L. rhamnosus* GG 株を妊婦に投与すると、新生児のアレルギー発現率が低下することが報告されている^{46), 90)}。今後、KW3110 を妊婦に投与し、新生児における皮膚疾患などのアレルギー疾患の発現の軽減に有用であるかどうかを明らかにすることは興味深い。

Ⅲ-5 結論

本章において、KW3110 のプロバイオティクス活性と整腸効果を確認するため、in vitro 試験および健常日本人における KW3110 経口摂取試験を行った。バイオジェニックスとしてアレルギーへの有効性が明らかになっている KW3110 がプロバイオティクス活性を併せ持つことが確認された。すなわち、酸耐性、胆汁耐性をもち消化管下部に生きて到達すること、腸上皮細胞への接着性の高さから腸内の滞留時間が長いこと、大腸の腸内細菌叢を改善し整腸効果を有することが確認された。また、KW3110 の生存性や腸内細菌叢改善については摂取量依存的であることが確認された。

第IV章 総括

ヨーグルトは長年、健康的でおなかの調子を整える食品として一般的な食生活の中で広く使用されてきている。

プロバイオティクスは生きた微生物である点でヨーグルトに適合し、しばしば添加される。プロバイオティクスやそれを含んだヨーグルトは、近年問題となっている生活習慣病に対し、食の観点から特に腸の健康を維持・改善することすなわち整腸効果で、健康へ貢献する機能性食品として注目が集まっている。

整腸とは多角的な現象であり、*in vitro* のような限定的な実験系では十分な評価はできない。実験動物を用いた *in vivo* の系でも実際に使用するヒトとの動物種間差を埋めることはできない。実用を支えるためにはヒトでの評価が必要である^{5), 25)}。

ヒトが日常の食習慣の中でプロバイオティクスおよびそれを含んだヨーグルトを摂取する場合、一定の条件で摂取することは困難である。それは、食品は医薬品と異なり摂取量・頻度・時期などが指導管理下にならないためである。従って、摂取量の多少、プロバイオティクス菌種が異なる場合整腸効果がどのように現れるか、また安全性はどうかという点は、消費者にとって大きな関心事である。

多角的に評価されるべき整腸効果を検証する場合、各指標がどの被験者においても一律に動くことは考えにくい。特に食品による介入の場合は、用途の特性から医薬品に比べて作用を緩やかに設定することが大半であるため、各被験者および指標で鋭敏に動くものとそうでないものがあり、各指標の変化の有無と変化量、プロバイオティクスそのものの効果であるかどうか、および各指標の生理学的な関連性を一体に評価する必要がある。本研究では、条件ごとに、すなわちプロバイオティクスの種類により、またその摂取量により整腸効果がどう現れるかを検証した。整腸効果を示す指標は、腸内細菌叢として腸内有益菌の *Bifidobacterium* 菌数およびその占有率、便性として自覚できる指標である排便頻度と排便量、さらに便性をより明確に解明するために腸管通過時間を主に用いた。このような条件下での各指標の変化と生理学的な関連性を検証し、プロバイオティクスの整腸効果を評価した。

第2章第1節において、BB-12の有効性と摂取量依存性および過剰量摂取時の安全性を評価した。

初めに、BB-12有効性試験としてヒトにおけるBB-12ヨーグルトに含まれるBB-12の整腸効果を実験室条件下で重盲検対照比較クロスオーバー試験(RCT)で評価した。BB-12とそれ以外に3種の乳酸菌を用いて製造したヨーグルトとBB-12以外の3種の乳酸菌のみで製造したヨーグルトを摂取し、便性、腸内細菌叢および腸内環境の変化を観察した。1日当たりの摂取量は消費市場統計より100g/日とした²⁶⁾。

BB-12ヨーグルト摂取期で対照ヨーグルト摂取期と比べて、便秘傾向者群で排便日数の増加、Bacteroidaceae占有率の低下、*Bifidobacterium*菌数の増加、*Bifidobacterium*占有率の上昇およびEnterobacteriaceae占有率の低下が見られた。被験者全体では、Bacteroidaceaeの菌数の減少、*Bifidobacterium*菌数の増加、Bacteroidaceae占有率の低下、*Bifidobacterium*占有率の上昇および酪酸量の増加が見られた。非便秘傾向者群では、*Bifidobacterium*菌数の増加および*Bifidobacterium*占有率の上昇が見られた。

BB-12ヨーグルト摂取期における便性改善効果は、便秘傾向者群で確認され、被験者全体と非便秘傾向者群では確認されなかった。一方、SCFA量は被験者全体と非便秘傾向者群で有意な変化があったものの便秘傾向者群ではなかった。

プロバイオティクスの整腸効果への作用機序は次のように推定されている。プロバイオティクスが生きて腸に到達することで腸内細菌叢の*Bifidobacterium*菌数が増加したり他の菌が増減したりする。次に、プロバイオティクス自身および増減した腸内細菌の影響でSCFAの産生が多くなる。SCFAは腸上皮細胞に吸収されエネルギー源となり腸蠕動運動を促進することで、排便が促進される³⁵⁾。本研究では、排出された便を分析に用いているが、この段階ではSCFAは腸上皮細胞に吸収され消費された後である可能性がある。SCFA量の変化が便秘傾向者群ではなく、むしろ非便秘傾向者群で見られたのは、便秘傾向者群では便の腸内滞留時間が長く、SCFAが吸収される機会がより多いためかも知れない。これらの観察からさらに深く整腸効果を理解するためには、腸管内容物の通過時間を評価することが重要であると考えられた。

続いて、BB-12摂取量依存性試験としてBB-12ヨーグルトの摂取量依存性を評価した。BB-12ヨーグルトを1日当たり80gまたは150g、14日間連続摂取し、整腸効果を観察した。機能性食品をデザインするときに

最低有効摂取量の設定は重要である。摂取時の有効性を確保する点と、副作用の発生が懸念される過剰摂取を回避する基準となるためである。双方とも機能性食品を論理的根拠に基づいて使用するためには必須の要件である。

80g 群では *Bifidobacterium* 菌数および占有率の上昇および糞便アンモニア量の減少が見られ、150g 群では排便量の増加、色の黄色化、Bacteroidaceae 占有率の低下、*Bifidobacterium* 菌数の増加および占有率の上昇、*Clostridium lecithinase* (+) 菌数の増加および占有率の低下、*Streptococcus* 菌数の減少および占有率の低下および糞便アンモニア量の減少が見られた。

各指標それぞれに摂取量依存性が認められた訳ではないが、総合的に比較すると 80g/日～150g/日の間で摂取量依存性が確認され、整腸効果への影響についてはこの範囲に最低有効摂取量があると考えられた。また、BB-12 有効性試験において、BB-12 ヨーグルトを 100g/日摂取して有効性を確認していることから、最低有効摂取量は 100g/日であると考えられた。

各被験者個人ベースで、腸内細菌叢の *Bifidobacterium* 占有率を調べた。80g 群で 7 例中 6 例で、150g 群で 8 例中 8 例という高い確率で腸内細菌叢の *Bifidobacterium* 占有率が上昇したが、大きく *Bifidobacterium* 占有率が上昇した場合や上昇幅が小さかった場合があり、ばらつきが大きかった。

瀧口らが *Lactobacillus acidophilus* SBT 2062 と *Bifidobacterium longum* SBT 2928 を用いたプロバイオティクスヨーグルトで同様の報告をしている¹⁰⁾。摂取量は 100g/日のみであるが、腸内細菌叢の *Bifidobacterium* 占有率を 9 名の被験者を用いて示した。当試験と同様、個人間で大きなばらつきがあり、感受性に差があることが観察されている。

プロバイオティクスの種類と個人で、有効な場合とそうでない場合があると一般的に言われるが、十分な検証はなされておらず定説はない。個人間での腸内細菌叢の *Bifidobacterium* 占有率への感受性がその一部を示しているかもしれない。しかし、体系的に検証するには、同一の被験者で継続的に異なったプロバイオティクスを摂取し効果を観察するといった評価方法が求められる。この先、プロバイオティクスの集団としての評価が尽くされ個人へ適用していく段階では、このような評価も必要になるであろう。

さらに、BB-12 過剰量摂取試験として過剰量と考えられる 450g/日を摂取し 14 日間連続摂取で排便状況、

糞便性状および随伴症状を観察した。摂取期中に事前観察期または事後観察期と比べて、排便頻度と排便量は多くなり、その他の項目も、摂取量依存性の評価で観察されたことと類似していた。また、過剰量摂取しても排便状況や糞便性状が激変し下痢様の状態になることはなく、異常な随伴症状も観察されなかった。

以上第2章第1節の研究により、BB-12に整腸効果があることが確認され、引き続き整腸効果発現を理解するために腸管通過時間を評価することが期待された。また BB-12 ヨーグルトの整腸効果には通常の摂取量の範囲で摂取量依存性が確認され、最低有効摂取量は 100g/日であると考えられた。過剰量摂取では便性の変化はあるものの健康に有害な影響はないことが確認された。

第2章第2節において、DN173010の腸管通過時間を中心とした整腸効果を評価した。DN173010はBB-12と同菌種で異なる菌株のプロバイオティクスであり、これまでに日本人で整腸効果を検証した報告はない。

DN173010とそれ以外に3種の乳酸菌を用いて製造したヨーグルトとDN173010以外の3種の乳酸菌のみで製造したヨーグルトを摂取し、腸管通過時間、便性、腸内細菌叢および腸内環境の変化をDN173010有効性試験で評価した。

便通の状態には個人差があり画一的に便秘を定義することは難しい。便秘は単に排便の頻度が少ないということではないが、一般的には排便が3日以上ない、あるいは週に3回以下しかないといった排便頻度に加え、排便の困難さ、残便感を指標に診断されている³⁴⁾。排便頻度はこのように便秘症の診断にも用いられ、腸の調子を知る上で分かりやすい指標である。

一方で、食物を経口摂取してから排便するまでの時間を示す腸管通過時間は、腸の動きを直接的に示す指標としてヨーロッパで用いられてきた^{52), 53), 54), 55)}。

Meanceらは、イタリアで200名の50-70歳の健常者を用いて類似の試験を実施している⁵⁵⁾。この試験によると、腸管通過時間が40-50時間のグループに比べ、50時間以上のグループでより大きく腸管通過時間が短縮された。興味深いことに、摂取量を125g/日と250g/日として2週間の継続摂取で比較し腸管通過時間の短縮効果に摂取量依存性を見出している。腸管通過時間が50時間以上のグループでは125gの場合は

50.0±6.0 時間(摂取前 68.7±8.3)、250g の場合は 42.0±5.3 時間(摂取前 68.2±9.2)としている。また、腸管通過時間が 40-50 時間のグループでは 125g の場合は 36.8±3.7 時間(摂取前 46.3±2.3)、250g の場合は 26.9±3.7 時間(摂取前 46.3±2.4)でありやはり摂取量依存性を認めている。結論として摂取量と腸管通過時間の短縮効果の間に対数関数の相関があるとしている。

本試験の STT 群、Meance らの MTT+STT 群が腸管通過時間の定義上同一である。試験食品の摂取量は当試験で 170g/日、Meance らは 1serving が 125g で、1-3serving で解析を行っている。当試験の摂取量は Meance らの 1.36serving に当たる。1.36 serving で腸管通過時間の短縮分 46.48 時間を当てはめると、Meance らの関数を上回るように見える。

両試験を単純に比較することは、試験デザインや被験者の背景の違い(人種、年齢、生活習慣)からできないが、当試験での効果の方が大きいように見える。これは、観察期の腸管通過時間(当試験で 81.16 時間、Meance らの 46.3 時間~68.7 時間)がより長かったため腸管通過時間短縮幅が大きくなったことによると考えられる。一般に、日本を含むアジア地域では食物繊維をより多く含む食餌習慣からヨーロッパより腸管通過時間が長いと言われ、この考察と一致する。

当試験では、このようにヨーロッパで先行して行われた試験と整合性のある結果を示し、かつ DN173010 単独の効果を示した点で新しい。今後、さらに正確な条件下で地域間差を評価することが期待される。

排便頻度は、日常生活の中で腸の調子、特に便秘であるかどうかを評価する最も分かりやすい指標である。しかし、腸内容物が細切れで排泄されるような場合は排便頻度が上がるものの、腸の健康状態がよいとは必ずしも言えない。この点で腸管通過時間はより直接的に腸の動きを表しており、有用であるといえる。

これまでに、排便頻度と腸管通過時間の両方でプロバイオティクスの便通への影響を評価した報告はなく、当試験で初めて試みた。排便頻度、腸管通過時間共に、DN173010 の摂取で改善し、双方整合性のある結果を示した。このことに加えて、排便量も DN173010 の摂取で増加している。この 3 点を総合して考察すると、腸の動きが鈍く腸内容物が多く腸内に滞っている状態で DN173010 を摂取すると、腸の動きが活性化し腸管通過時間が短縮され、排便量と排便頻度が同時に上がることで滞っていた腸内容物を排泄したと考えられる。このことは、便秘が多くの人にとって不快なことだと受け止められているという感覚的な点、不要になった腸

内容物を速やかに体外に排泄することで腸内腐敗を防ぎ腸内環境を良好に保つ点から、腸の調子を整え宿主の健康に寄与する。

腸内細菌叢では *Bifidobacterium* 菌数が増加し占有率が上昇した。*Bifidobacterium* は腸内細菌叢の中でも宿主に有益な影響を持つ菌であることが知られている。プロバイオティクス摂取による排便頻度の増加と腸内 *Bifidobacterium* 菌数の増加と占有率の上昇を同時に観察した報告は多く存在し、*Bifidobacterium* は便性改善の主な因子だと考えられている。^{9), 10), 14), 15), 22), 43), 44)}

一方で *Clostridium lecithinase* (+) 菌数が減少した。DN173010 の摂取で腸内 β -グルクロニダーゼ活性が低下するとの報告がある。⁵⁶⁾ *Clostridium lecithinase* (+) は腐敗性細菌であり腸内酵素活性のうち β -グルクロニダーゼ、ニトリダクターゼ、トリプトファンナーゼ活性を増加させることが報告されていて⁵⁷⁾、大腸ガンへの関与が推測されている。

これら腸管通過時間の短縮、便性の改善、腸内細菌叢の改善は相互に関係しあっていると考えられるが、その作用機序は本節では明確に示すことができない。特に、糞便の水分、pH、アンモニア量、SCFA 量のデータからは、腸内で起こっていることを整合性を持って説明することはできない。今後、ヒトでの試験においても、より腸内に近い条件で腸内容物を採取する方法の検討、より精度が高くまた大量に分析が可能な方法の検討を行い、明確に作用機序を解明することが必要である。

以上第 2 章第 2 節の研究により、RCT において DN173 010 の摂取で腸管通過時間および排便状況、さらに腸内細菌叢が改善することで整腸効果が得られ、特に腸管通過時間が長い場合に顕著であることが明らかとなった。

第 III 章において、*Bifidobacterium lactis* と異なる菌種 KW3110 のプロバイオティクス活性と整腸効果を評価した。

KW3110 は抗アレルギー効果を持つ乳酸菌として藤原らによって選抜されたバイオジェニクスである。一方、腸内細菌叢がアレルギーに関与していることを示唆する報告もある。Björkstén らは、アレルギーの子どもの腸内細菌叢は健常な子どものそれとは異なっていることを報告しており⁶⁴⁾、また Wickens らは、乳幼児期

の抗生物質投与がその後のアレルギー疾患発症のリスク因子であり、その原因が腸内細菌叢の変化だと推察している⁷¹⁾。さらに Kalliomaki らは、プロバイオティクスを妊婦や授乳婦および新生児に投与し、アレルギーの発症が抑えられたことを報告している⁴⁶⁾。以上のことから、腸内細菌叢とアレルギーは関係していて、腸内細菌叢を改善するプロバイオティクスにはアレルギーを改善する効果があると考えられる。KW3110 にプロバイオティクス活性があるとすれば、バイオジェニクスとして菌体のみでなく、腸内細菌叢の改善を通じて抗アレルギー活性を示すことも期待できる。そこで KW3110 にプロバイオティクス活性があり、腸内細菌叢の改善効果があるかどうかを *in vitro* およびヒトで確認することにより、本菌の整腸効果への応用の可能性の評価を行った。KW3110 は *in vitro* で高い酸耐性、胆汁酸耐性および腸管接着性を示した。さらにヒトにおける KW3110 ヨーグルト経口摂取試験で KW3110 が生きて腸に到達すること、腸内細菌叢を改善することが確認され、プロバイオティクス活性を有していることが確認された。

さらに本章では、通常摂取量の範囲内の 100g/日に加え、通常摂取量以下として 10g/日を設定し、影響を評価した。腸内細菌叢では、100g 摂取期の Day 3 で Day -1 に比べ有意に *Bifidobacterium* 菌数が増加し、その他の KW3110 摂取中の日には、100g 摂取期、10g 摂取期ともに有意ではないものの同様の傾向を示した。*Bifidobacterium* 菌数占有率も同様の傾向であった。排便頻度と排便量も同様に増加する傾向であった。

上記の結果から、KW3110 を含んだヨーグルトの 10g/日から 100g/日までの摂取で腸内細菌叢の改善および便性改善といった整腸効果が摂取量依存的にあるものと考えられた。

Bifidobacterium lactis BB-12 で観察した整腸効果と併せて比較すると、双方とも摂取量が多いほど整腸効果がより強くより多くの指標で現れ、摂取量依存性が観察された。腸内細菌叢、特に *Bifidobacterium* 菌数および *Bifidobacterium* 占有率で比較的鮮明に摂取量依存性が現れ、便性改善は差が現れにくい場合もあったものの、同様の傾向であった。このことから、KW3110 と *Bifidobacterium lactis* の異なる菌種でもプロバイオティクスとして類似性の高い整腸効果を持つことが示された。プロバイオティクスの有効性は菌株毎に異なると言われている。前述の類似性は、条件が重なった偶然であるかそれとも各菌株に共通性があることによるのかは、さらなる検討が必要である。しかし、本研究で用いた 3 菌株とも酸耐性、胆汁酸耐性は非常に高い点が共通していて、生きて腸に届く点がプロバイオティクスによる整腸効果に影響を与えていることが推察さ

れた。

KW3110 はバイオジェニックスとして開発された菌株であるが、プロバイオティクス活性を有することも確認された。両効果とも細菌とホストとのクロストークの中で発現しているものと考えられるが、作用点や作用機序、および生菌・死菌・代謝物の違いによる影響は深く検討されていない。ホストと腸内細菌叢のクロストークは活性化している研究領域の一つであり、今後より実用の場面を再現できる評価系の確立を期待したい。

以上第Ⅲ章の研究により、*Bifidobacterium lactis* と異なる菌種の KW3110 のプロバイオティクス活性を確認すると共に、腸内細菌叢の摂取量依存的な改善と排便状況の改善が観察され、整腸効果があるものと推察された。第Ⅱ章の結果と併せると、異なる種のプロバイオティクスを比較し類似性の高い整腸効果が発現することが示された。

本研究の試験食品として用いたヨーグルトには、評価対象とした3種類のプロバイオティクスの他にも共発酵のための乳酸菌を用いている。BB-12ヨーグルトでは *L. acidophilus*、*St. thermophilus* および *Lc. lactis* 用い、DN173010ヨーグルトでは *St. thermophilus*、*Lc. lactis*、*L. bulgaricus*を用いた。これらの菌だけで調製したヨーグルトでも便性の改善は観察されたがプロバイオティクスヨーグルトに比べるとその効果は弱く、腸内細菌叢の改善についても同様であった。3種類のプロバイオティクスは酸耐性と胆汁酸耐性を持ち大腸へ生きて到達する点が共発酵用乳酸菌と異なる。摂取した生菌が生きて大腸へ届くことが整腸効果にどう影響しているのか、分からない点が多い。今後プロバイオティクスをより深く理解していくために残された課題だと言える。

Metchnikoff が唱えた寿命に影響を与える腸内腐敗に関して、その程度を調整する要因として、食事成分、腸管運動、腸内細菌叢が考えられる。食事成分は腸内腐敗産物の元となるタンパク質の摂取、腸管運動は腸内細菌による腐敗を起こすための時間、腸内細菌叢はタンパク質を分解するための酵素を多く持つ腸内菌がどのくらい生息するか、といった点が関与しそのバランスにより腸内腐敗の進行度が決まる。腸内で不要になったものを速やかに体外に排泄し結果として腸内腐敗を抑えることは、整腸効果の主要な構成要素であり、日常生活習慣の中で健康に貢献する要素であると言える。

本研究では、摂取したプロバイオティクスが、腸内細菌叢を改善し、腸管運動を亢進し腸内不要物の排泄

を促進することで、整腸効果を発現することを示した。このことは、食習慣の改善という方法で、生活習慣病やさらには寿命への悪影響を抑制することができることを示唆している。プロバイオティクスの特定の疾病（ガン、アレルギー、感染症、炎症性腸疾患など）への効果が盛んに研究されていて、近い将来プロバイオティクスの個人への適用が可能となり、健康長寿へ貢献することが期待される。

結論として、3 種のプロバイオティクスの整腸効果を、食品の形（プロバイオティクスヨーグルト）でヒトにおいて RCT を用いたプロバイオティクスの有効性評価、摂取量依存性、過剰量摂取時の安全性といった多角的な方法で検証し、腸内細菌叢の改善、便性および腸管通過時間の改善といった点で整合性のある効果を観察した。このことからプロバイオティクスヨーグルトは、日常的な摂取において整腸効果を発現し、食生活の面で健康に貢献することが明らかとなった。

要約

近年日本では高齢化が急速に進行している。年齢が高くなれば健康面の懸念も増え、それに伴い健康長寿へのニーズも社会全体のレベルで高まっている。高齢社会の中で生活習慣の視点で健康を見るとき、食習慣が重要な位置にある。最近、食習慣の欧米化が著しいと言われ、生活習慣病との関連が指摘されている。プロバイオティクスは、生活習慣病への食からの対策として有望視される機能性食品の一つであり、「適正量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体」と定義されている。プロバイオティクスの有用な作用に整腸効果が挙げられる。腸内で不要になったものを速やかに体外に排泄し結果として腸内腐敗を抑えることは、整腸効果の主要な構成要素であり、日常生活習慣の中で健康に貢献することにつながる。

現在すでに、日本の食品市場にいくつかのプロバイオティクス製品が存在し、一般消費者の日常的使用に提供されている。しかし、有効性、作用機序など選択や消費のための情報が十分提供されているとは言えない。プロバイオティクス菌種間あるいは菌株間で有効性にさがあるのか、有効性を確かにするための付帯条件は何か(摂取量、摂取方法)、腸内細菌叢の変化(有益菌、有害菌の増減)、生きて腸に届くかどうか、といった情報を提供するには、ヒトでのデータが必須である。

本研究では、消費者のより良い食生活への貢献を志し、消費者が日常生活の中でプロバイオティクスを摂取する際に経験することを科学的視点で解き明かすことに主眼を置いた。腸内細菌叢中の *Bifidobacterium* の変化を中心に、排便頻度や排便量といった日常生活の中で気付く指標の他に、腸の動きをより直接的に示す腸管通過時間も用い、プロバイオティクスの整腸効果への関与について検討した。

1. *Bifidobacterium lactis* BB-12 の整腸効果と摂取量依存性および過剰量摂取時の安全性の評価

Bifidobacterium lactis BB-12 を用いたヨーグルトを摂取する BB-12 有効性試験では、無作為化対照比較試験(RCT)を用い、BB-12 が有意に腸内細菌叢中の *Bifidobacterium* を増加させ便秘傾向者群で排便頻度を上げることが観察された。また摂取量依存性試験では摂取量依存的な整腸効果が、過剰量摂取試験では過剰摂取しても健康上問題ないことが観察された。また、さらに深くプロバイオティクスの便性への影響を理解するためには、腸管通過時間の評価が必要と考えられた。

2. *Bifidobacterium lactis* DN173010 のヨーグルト摂取ヒト無作為化比較試験での腸管通過時間を中心とし

た整腸効果の評価

Bifidobacterium lactis DN173010 を用いた DN173010 有効性試験では、無作為化対照比較試験(RCT)を用い、腸内細菌叢中の *Bifidobacterium* の菌数変化と便性改善に加えて腸管通過時間を評価した。その結果、*Bifidobacterium* 菌数増加、*Clostridium* lecithinase(+)の減少といった腸内細菌叢の改善、排便頻度、排便量、腸管通過時間の整合性のある改善が、腸管通過時間が長い集団において観察された。これらを総合して考察すると、腸の動きが鈍く腸内容物が多く腸内に滞っている状態で腸内細菌叢の *Bifidobacterium* を増加させるような介入を行うことで、腸の動きが活性化し腸管通過時間が短縮され、排便量と排便頻度が同時に上がることで滞っていた腸内容物を便として排泄したと考えられる。

3. *Lactobacillus paracasei* KW3110 のプロバイオティクス活性と整腸効果の評価

Bifidobacterium lactis と異なる属として *Lactobacillus paracasei* KW3110 を評価した。バイオジェニックスとして開発された当株の酸耐性、胆汁酸耐性、腸上皮細胞への接着性といったプロバイオティクス活性を *in vitro* で確認し、さらに、ヒトで大腸へ生きて届くことと腸内細菌叢を改善し整腸効果を有することが摂取量依存的に観察された。

結論として、3 種のプロバイオティクスの整腸作用をヒトにおいてヨーグルトの形態で摂取し多角的に検証した。その結果、整合性のある有効性を観察し、ヒトの日常的な摂取において腸の健康維持に有用であることが示唆された。

キーワード

腸内細菌叢、プロバイオティクス、*Bifidobacterium*、ヨーグルト、ヒト、整腸効果、排便頻度、腸管通過時間、無作為化対照比較試験(RCT)、健常日本人、*Bifidobacterium lactis* BB-12、*Bifidobacterium lactis* DN173010、*Lactobacillus paracasei* KW3110

Key words

Intestinal microbiota, Probiotics, *Bifidobacterium*, Yogurt, Humans, Improvement of intestinal conditions, Frequency of defecation, Gastrointestinal tract transit time, Randomized controlled trial(RCT), Healthy Japanese, *Bifidobacterium lactis* BB-12, *Bifidobacterium lactis* DN173010, *Lactobacillus paracasei* KW3110

謝辞

本研究に深く関わっていただきました、昭和女子大学大学院生活機構研究科飯野久和教授に深くお礼申し上げます。飯野教授には構成論文 4 報全てに共著者になっていただいただけでなく、ヒト試験で被験者のコーディネート、腸内細菌叢分析の施設使用および分析技術の指導など、幅広くご指導いただきました。

また、KW3110 の *in vitro* での研究については、キリンホールディング株式会社フロンティア技術研究所で実施されたものであり、この部分および論文化にお力添えをいただいた藤井敏雄氏に深謝申し上げます。

最後に、学生時代に温かく指導していただいた東京農工大学大学院農学研究院、矢ヶ崎一三教授に心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 1) E. Metchnikoff, 平野威馬雄訳：長寿の研究－樂觀論者のエッセイ，幸書房（2006）.
- 2) Tissier : Recherches sur la flora intestinale normale et pathologique du nourison,
These de Paris, P.253 (1900)
- 3) T. Mitsuoka : *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. I. Orig. A* , 34, 219-233 (1976)
- 4) R. Fuller : *J. Appl. Microbiol.* , 66 (5), 365-378 (1989)
- 5) Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics
in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 (2002)
- 6) 乳酸菌ニュース, 社団法人全国はっ酵乳乳酸菌飲料協会, 453, (2006)
- 7) 細野明義：発酵乳の科学 乳酸菌の機能と保健効果, アイ・ケイコーポレーション, 東京 (2002)
- 8) 高野俊明: 乳酸菌の科学と技術, 学会出版センター, 東京, p.316-317 (1996).
- 9) 山野俊彦, 高田麻実子, 福島洋一, 飯野久和: 腸内細菌学雑誌, 18, 15-23 (2004).
- 10) 瀧口隆一, 宮本真理, 望月英輔, 鈴木 豊, 景山良治, 飯野久和: 腸内細菌学雑誌, 11, 117-122
(1998).
- 11) 松本光晴, 今井哲哉, 廣中貴宏, 久米仁司, 渡辺正利, 辨野義巳: 腸内細菌学雑誌, 14, 97-102
(2001).
- 12) 森 清, 中川和周, 矢嶋信浩, 近松 均, 村山力: 健康・栄養食品研究, 5, 11-27 (2002).
- 13) 齊藤康雄, 吉村 真, 瀧澤 悟, 辨野義巳: 健康・栄養食品研究, 6, 1-9 (2003).
- 14) 勝野真也, 岡田 恵, 川合伸一, 宝野英紀, 小暮怜美, 中澤勇二, 寺田 厚: 腸内細菌学雑誌, 17,
27-34 (2003).
- 15) 勝野真也, 岡田 恵, 川合伸一, 宝野英紀, 小暮怜美, 中澤勇二, 寺田 厚: 腸内細菌学雑誌, 17,
35-41 (2003).
- 16) 久米村恵, 戸羽正道, 曾川芳郎, 清水精一, 川口信三: 腸内細菌学雑誌, 15, 15-20 (2001).
- 17) T. Mitsuoka: *Bifidobacteria Microflora* , 1, 3-24 (1982).
- 18) 田中隆一郎, 遠山 清, 諸富正巳, 高山博夫, 南野昌信, 黒島敏方, 務台方彦: 腸内フローラと発癌,
学会出版センター, 東京, p.79-103 (1981).

- 19) 光岡知足:ビフィズス菌の研究, 日本ビフィズス菌センター,東京,p.113-134 (1994).
- 20) 細野明義:ミルク総合事典,朝倉書店,東京,p.126-128 (1992).
- 21) M. Tojo, T. Oikawa, Y. Morikawa, N. Yamashita, J. Iwata, R. Tanaka: *Acta Paediatr Jpn*, 29, 113- 134 (1987).
- 22) 西田 聡, 後藤正巳, 阿久津里美, 小野真智子, 人見能貴, 中村智彦, 飯野久和:ミルクサイエンス, 53 (2004).
- 23) T. Nakamura, S. Nishida, Y. Shirasu, T. Murayama: *Jpn J Med Pharm Sci*, 43:1123-1130 (2000).
- 24) 西野博一, 山田弘徳, 池田義雄:食物繊維, 第一出版, 東京, p.314 (1995).
- 25) 光岡知足:腸内細菌の世界, 叢文社, 東京,(1980).
- 26) 2003年チルドデザートの世界分析調査, (株)総合企画センター大阪, 大阪, (2003).
- 27) 瀧口隆一, 宮本真理, 望月英輔, 鈴木 豊, 飯野久和:腸内細菌学雑誌, 11, 19-24 (1997).
- 28) 湧口浩也:酪農科学・食品の研究, 33, A203-A212 (1984).
- 29) 福島洋一, 山野俊彦:腸内細菌学雑誌, 17, 1-8 (2003).
- 30) E. Isolauri, T. Arvola, Y. Sutas, E. Moilanen, S. Salminen : *Clin. Exp. Allergy*, 30, 1604-1610 (2000).
- 31) A. Biffi, D. Coradini, R. Larsen, L. Riva, G. DiFronzo : *Nutr. Cancer*, 28(1), 93-99 (1997).
- 32) 印南 敏: *FOOD style*21, 2, 30-34 (1998).
- 33) 光岡知足:ビフィズス菌—腸内細菌と健康とのかかわり合い—, 学会出版センター, 東京, p.181 (1978).
- 34) 吉田 豊:新臨床内科学, 第6版, 医学書院, 東京, p.515-517 (1993).
- 35) T. Yokokura, T. Yajima, S. Hashimoto : *Life Sci*, 21, 59-62 (1977).
- 36) T. Nakamura, K. Agara, S. Nishida, Y. Shirasu, H.Iino : *Bioscience Microflora*, 20, 27-34 (2001).
- 37) E. Armitage, H.E. Drummond, D.C. Wilson, S. Ghosh : *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 13, 1439-1447 (2001).
- 38) E.V. Jr.Loftus, W.J. Sandborn :, *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 31, 1-20 (2002).
- 39) M.A. Eastwood, J.R. Kirkpatrick, W.D. Mitchell, A. Bone, T. Hamilton: *Br. Med. J.*, 4, 392-394 (1973).

- 40) M. Blaut, *Eur. J. Nutr.*, 41 (Suppl 1), I/11– I/16 (2002).
- 41) T. Mitsuoka: *Farumashia*, 5, 608–609 (1969). (in Japanese)
- 42) K. Matsumoto, T. Takada, K. Shimizu, Y. Kado, K. Kawakami, I. Makino, Y. Yamaoka, K. Hirano : *Biosci. Microflora*, 25, 39–48(2006).
- 43) T. Arvola, K. Laiho, S. Torkkeli, H. Mykkanen, S. Salminen, L. Maunula, E. Isolauri : *Pediatrics*, 104, e64 (1999).
- 44) T. Yaeshima, S. Takahashi, N. Matsumoto, N. Ishibashi, H. Hayasawa, H. Iino : *Biosci. Microflora*, 16, 73–77 (1997).
- 45) K. Namba, T. Yaeshima, N. Ishibashi, H. Hayasawa, S. Yamazaki : *Biosci. Microflora*, 22, 85–91 (2003).
- 46) M. Kalliomaki, S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen, E. Isolauri : *Lancet*, 357, 1076–1079 (2001).
- 47) J.Z. Xiao, S. Kondo, N. Yanagisawa, K. Miyaji, K. Enomoto, T. Sakoda, K. Iwatsuki, T. Enomoto : *Allergol. Int.*, 56, 67–75 (2007).
- 48) G. Schaafsma, W.J. Meuling, W. van Dokkum, C. Bouley : *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52, 436–440 (1998).
- 49) K. Aihara, O. Kajimoto, H. Hirata, R. Takahashi, Y. Nakamura : *J. Am. Coll. Nutr.*, 24, 257–265 (2005).
- 50) N. Berrada, J.F. Lemeland, G. Laroche, P. Thouvenot, M. Piaia : *J. Dairy Sci.*, 74, 409–413 (1991).
- 51) P. Pochart, P. Marteau, Y. Bouhnik, I. Goderel, P. Bourlioux, J.C. Rambaud : *Am. J. Clin. Nutr.*, 55, 78–80 (1992).
- 52) M. Bouvier, S. Meance, C. Bouley, J.L. Berta, J.C. Grimaud : *Biosci. Microflora*, 20, 43–48 (2001).
- 53) S. Pathmakanthan, S. Meance, C.A. Edwards : *Microbiol. Ecol. Human Dis.*, 12 (1 Suppl 2), 10–30 (2000).
- 54) P. Marteau, E. Cuillerier, S. Meance, M.F. Gerhardt, A. Myara, M. Bouvier, C. Bouley, F. Tondou, *G. Bommelaer, J.C. Grimaud : Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16, 587–593 (2002).
- 55) S. Meance, C. Cayuela, A. Raimondi, P. Turchet, C. Lucas, J.C. Antoine : *Microb. Ecol. Health Dis.*,

- 15:15–22 (2003).
- 56) H. Abdelali, P. Cassand, V. Soussotte, M. Daubeze, C. Bouley, J.F. Narbonne : *Nutr. Cancer*, 24, 121–132 (1995).
- 57) K. Endo : *Intestinal Microflora and Bio-homestais* ed. by T. Mitsuoka, p. 31–51, Gakkai Shuppan Center, Tokyo, (1989) (in Japanese)
- 58) S. Salminen, C. Bouley, M. Boutron-Ruault, J.H. Cummings, A. Franck, G.R. Gibson, E. Isolauri, M.C. Moreau, M. Roberfroid, I. Rowland : *Br. J. Nutr.*, 80 (Suppl. 1), 147–171 (1998).
- 59) G.R. Gibson, M.B. Roberfroid : *J. Nutr.*, 125, 1401–1412 (1995).
- 60) K. Matsumoto, T. Takada, K. Shimizu, Y. Kado, K. Kawakami, I. Makino, Y. Yamaoka, K. Hirano, A. Nishimura, O. Kajimoto, K. Nomoto : *Biosci. Microflora*, 25, 39–48 (2006).
- 61) M.R. Gismondo, L. Drago, A. Lombardi : *Int. J. Antimicrob. Agents*, 12, 287–292 (1999).
- 62) Y. Fukushima, T. Yamano, A. Kusano, M. Takada, M. Amano, H. Iino : *Bioscience and Microflora*, 23, 139–147 (2004).
- 63) P. Gionchetti, F. Rizzello, A. Venturi, P. Brigidi, D. Matteuzzi, G. Bazzocchi, G. Poggiolis, M. Miglioli, M. Campieri : *Gastroenterology*, 119, 305–309 (2000).
- 64) B. Björkstén, P. Naaber, E. Sepp, M. Mikelsaar : *Clin. Exp. Allergy*, 29, 342–346 (1999).
- 65) K. Nakajima, Y. Hata, Y. Osono, M. Hamura, S. Kobayashi, N. Watanuki : *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 18, 181–187 (1995).
- 66) G. Schaafsma, W. Meuling, W. van Dokkum, C. Bouley : *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52, 436–440 (1998).
- 67) N. Roos, M. Katan : *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 405–411 (2000).
- 68) D. Fujiwara, S. Inoue, H. Wakabayashi, T. Fujii : *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 135, 205–215 (2004).
- 69) D. Fujiwara, H. Wakabayashi, H. Watanabe, S. Nishida, H. Iino : *Allergol. Int.*, 54, 143–149 (2005).
- 70) H. Wakabayashi, C. Nariai, F. Takemura, W. Nakao, D. Fujiwara : *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 145, 141–151 (2007).
- 71) K. Wickens, N. Pearce, J. Crane, R. Beasley : *Clin. Exp. Allergy*, 29, 766–771 (1999).
- 72) F. Yan, D.B. Polk : *J. Biol. Chem.*, 277, 50959–50965 (2002).

- 73) M.H. Coconnier, V. Lievin, M. Lorrot, A.L. Servin : *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1152–1157 (2000).
- 74) T. Nakamura, K. Agata, M. Mizutani, H. Iino : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 774–780 (2001).
- 75) T. Matsuki, K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto, H. Oyaizu, R. Tanaka :
Appl. Environ. Microbiol., 68, 5445–5451 (2002).
- 76) M.S. Jackson, A.R. Bird, A.L. McOrist : *J. Microbiol. Methods*, 51, 313–321 (2002).
- 77) L.J. Ward, M.J. Timmins : *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 90–92 (1999).
- 78) C.N. Jacobsen, V. Rosenfeldt Nielsen, A.E. Hayford, P.L. Moller, K.F. Michaelsen, A. Parregaard,
B. Sandstrom, M. Tvede, M. Jakobsen : *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4949–4956 (1999).
- 79) M. Liong, N.P. Shah : *J. Dairy Sci.*, 88, 55–66 (2005).
- 80) J. Prasad, H. Gill, J. Smart, P.K. Gopal : *Int. Dairy J.*, 8, 993–1002 (1998).
- 81) G.R. Bender, R.E. Marquis : *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2124–2128 (1987).
- 82) M.G. Sturr, R.E. Marquis : *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2287–2291 (1992).
- 83) K.M. Tuohy, M. Pinart-Gilberga, M. Jones, L. Hoyles, A.L. McCartney, G.R. Gibson :
J. Appl. Microbiol., 102, 1026–1032 (2007).
- 84) T. Yamano, H. Iino, M. Takada, S. Blum, F. Rochat, Y. Fukushima : *Br. J. Nutr.*, 95, 303–312 (2006).
- 85) Y. Miyoshi, S. Okada, T. Uchimura, E. Satoh : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 1622–1628 (2006).
- 86) J. Sillanpaa, B. Martinez, J. Antikainen, T. Toba, N. Kalkkinen, S. Tankka, K. Lounatmaa, J. Keranen,
M. Hook, B. Westerlund-Wikstrom, P. Pouwels, T.K. Korhonen : *J. Bacteriol.*, 182, 6440–6450 (2000).
- 87) D. Granato, F. Perotti, I. Masserey, M. Rouvet, M. Golliard, A. Servin, D. Brassart :
Appl. Environ. Microbiol., 65, 1071–1077 (1999).
- 88) D. Granato, G.E. Bergonzelli, R.D. Pridmore, L. Marvin, M. Rouvet, I.E. Corthesy-Theulaz :
Infect. Immun., 72, 2160–2169 (2004).
- 89) M. Schultz, C. Gottl, R. Young, P. Iwen, J. Vanderhoof : *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 38,
293–297 (2004).
- 90) M. Kalliomaki, S. Salminen, T. Poussa, E. Isolauri : *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119, 1019–1021 (2007).