

# N-1 乳酸菌のヒトにおける効能試験

日本獣医畜産大学 応用生命科学部  
寺 田 厚

## I. 目 的

人の健康と深く関わる腸管は第二の脳といわれ、そこに棲息する腸内菌は生活習慣病・便秘予防に重要な役割りを演じている。その有用菌は乳酸菌で、そのうちビフィズス菌は加齢と共に減少し、有害菌のクロストリジウムや大腸菌は増加する。そこで、この状況を改善するために健康を維持・増進する機能性食品（プロバイオテックス、プレバイオテックス、バイオジェニクス）の摂取が重要である。<sup>1)</sup>

その一つであるヨーグルトはプロバイオテックスといわれ、免疫力の増強、感染症・便秘の予防、ビタミンの生成などの効果が報告され、最近では、コレステロールの低減、血圧の抑制、アレルギーの予防などの効力が報告されている。これらの効果はそこに含まれる乳酸菌とその代謝産物の活性化が重要である。

そこで、ヨーグルトを人に摂取させ、腸内菌と腐敗産物について検討した。

## II. 材料および方法

### 1. 供試者および食事

ボランティアの健康成人（男性4名、女性6名；22～23歳）に、食事は普通食で、試験期間には他のヨーグルト、乳酸菌やオリゴ糖などを含有した食品の摂取を禁止した。ヨーグルトは10%脱脂粉乳となるように25℃温水で溶かし、この1,000ml脱脂粉乳に *Lactobacillus casei* N-1 培養ヨーグルト200mlを添加して、30℃48時間培養した。これを300ml/日を朝食後に14日間摂取し、それぞれ摂取前0日、摂取7日と14日目、摂取中止後7日に検体を採取し、腸内フローラ、腐敗産物、短鎖脂肪酸、大便pHおよび水分量を測定した。

Table 1 実験計画

	摂取前	摂取中		摂取後
	0日	7日	14日	7日
週	← 2 →	← 1 →	← 1 →	← 1 →
ヨーグルト (g/日)	0	300	300	0
サンプル採取 (日)	0	7	14	7
検査項目				
糞便の水分 (%)	*	*	*	*
pH	*	*	*	*
糞便フローラ	*	*	*	*
短鎖脂肪酸 ( $\mu\text{mol/g}$ )	*	*	*	*
アンモニア ( $\mu\text{g/g}$ )	*	*	*	*
硫化物 ( $\mu\text{g/g}$ )	*	*	*	*
フェノール類 ( $\mu\text{g/g}$ )	*	*	*	*
インドール類 ( $\mu\text{g/g}$ )	*	*	*	*

\*：実験項目

## 2. pHおよび水分量の測定

pHおよび水分量の測定：pHは糞便に直接ガラス電極pHメーター（堀場製作所）を差し込んで常法に準拠して測定した。水分は糞便1gを秤量し、赤外線水分計（Kett）によって測定した。

## 3. 腸内フローラの検索

腸内フローラは光岡の方法<sup>8)</sup>に準じ、3種類の非選択培地「嫌気性菌、好気性菌、特に嫌気性グラム陰性菌の分離に最適なEggerth-Gagnon (EG) 寒天培地、嫌気性菌、好気性菌、特に乳酸菌などの嫌気性グラム陽性菌に最適なglucose blood liver (BL) 寒天培地、好気性菌、特に大腸菌群、レンサ球菌、バチラスなどの分離に適したトリブチケース・ソイ (TS) 血液寒天培地」と11種類の選択培地「ビフィズス菌分離用bifidobacteria selective (BS) 寒天培地、バクテロイダッセイ分離用neomycin-brilliant green-taurocholate-blood (NBGT) 寒天培地、ユーバクテリウム分離用eubacteria selective (ES) 寒天培地、レンサナーゼ陽性クロストリジウム分離用ネオマイシン-ナグラ- (NN) 寒天培地、ペーヨネラやベプトストレプトコックスなどの分離用変法 veillonella selective (VS) 寒天培地、乳酸桿菌用変法 lactobacilli selective (LBS) 寒天培地、大腸菌群分離用 deoxycholate hydrogen sulfide lactose (DHL) 寒天培地、レンサ球菌分離用 triphenyltetrazolium chloride-acrigine orange-thallosulfate aesculin crystal violet (TATAC) 寒天培地、ブドウ球菌用フェニールエチルアルコールと卵

Table 2 腸内フローラの検索に使用された培地と培養法

培地	対象菌群	培養法と希釈	培養日数(37℃)
非選択培地			
BL寒天	嫌気性菌	スチールウール法	3
EG寒天	嫌気性菌	$10^{-5}, 10^{-3}, 10^{-6}$	
トリプチケースソイ血液寒天	好気性菌	空气中	1-2
		$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$ $10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}$	
選択培地			
BS寒天	ビフィズス菌	スチールウール法	3
ES寒天	ユーバクテリア		
NBGT寒天	バクテロイデス		
ネオマイシンNagler寒天	クロストリジウム		
VS寒天	ペーヨネラ	空气中	1
変法LBS寒天	乳酸かん菌		
DHL寒天	大腸菌群	空气中	2
TATAC寒天	連鎖球菌		
PEES寒天	ブドウ球菌		
NAC寒天	シュードモナス		
ポテトデキストローゼ寒天	酵母、カビ	$10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}$	2
熱処理サンプルに使用する培地			
BLおよびCW寒天	クロストリジウム	スチールウール法	

黄添加 staphylococcus 110 (PEES) 寒天培地、緑膿菌用 nalixidic acid cefrimide (NAC) 寒天培地、酵母とカビ用 poteto dextrose (PD) 寒天培地」を用いて検索した。その方法は、糞便検体 1 g を 10 倍希釈液で希釈し、 $10^{-6}$  から  $10^{-8}$  希釈液および  $10^{-1}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-7}$  希釈液を作り、それぞれの 0.05 ml を非選択培地の 1/3、および選択培地の 1/4 分画に塗抹して、それぞれの培養時間（2 日から 4 日）により培養した。さらに、レシチナーゼ陽性クロストリジウムは加熱処理は寺田らの方法<sup>11)</sup>、即ち、検体を 80℃ で 10 分間加熱し、BL 寒天培地と CW 寒天培地（栄研化学）の 1/3 分画に、 $10^{-1}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$  希釈液をそれぞれ 0.05 ml を塗抹して検査した。

#### 4. 短鎖脂肪酸の測定

短鎖脂肪酸は原らりの高速液体クロマトグラフィーの方法、即ち、前処理として、①検体 0.5g を取り、蒸留水 4.5 ml を加えて良く攪拌した後、冷蔵庫で一夜抽出する。②4℃ で、3,000 ~ 5,000 rpm、10 分間遠心分離する。③上澄みを 2.5 ml のシリンジで吸引し、0.45 μm のメンブランフィルターで濾過する。④オートサンプラー用のバイアル瓶にクロトン酸 0.1 ml を加えて攪拌後、分析用サンプルとする。移動層と緩衝液の調整；移動層は 5 mM の p-トルエンスルホン酸液 (951 mg/l)、緩衝液は 5 mM の p-トルエンスルホン酸液 (951 mg/l)、エチレンジアミン四酢酸液 (29 mg/l)、Bis-Tris (2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2,2,-nitriolo-triethanol, 98% ; 4.185 mg/l) の混合液である。

## 5. 腐敗産物の測定

腐敗産物について、アンモニアおよび硫化物は寺田らの方法<sup>24)</sup>で、アンモニアは検体1gを取り、蒸留水48.5mlおよび1M水酸化ナトリウム0.5mlを加えてスターラーで良く攪拌しながら、アンモニア隔膜電極で測定した。硫化物は検体1gを取り、蒸留水44mlおよびS-DIMB溶液5mlを加えてスターラーで良く攪拌しながら、硫化物イオン電極にて測定した。インドールやフェノール類は高速液体クロマトグラフィーの方法で、前処理は①検体1gを採り、3.9ml蒸留水と0.1gスルホサルチル酸を加えて良く攪拌し、冷蔵庫で一夜抽出する。②4℃で、3,000~5,000rpm、10分間遠心分離する。③上澄みを2.5mlのシリンジで吸引し、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過する。④オートサンプラー用のバイアル瓶に入れた後、分析用サンプルとする。移動層はメタノール6：蒸留水4の割合である。

インドールやフェノール類は高速液体クロマトグラフィーの方法で、前処理は①検体0.5gを採り、4.4ml蒸留水と0.1gスルホサルチル酸を加えて良く攪拌し、冷蔵庫で一夜抽出する。②4℃で、3,000~5,000rpm、10分間遠心分離する。③上澄みを2.5mlのシリンジで吸引し、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過する。④オートサンプラー用のバイアル瓶に入れた後、分析用サンプルとする。移動層はメタノール6：蒸留水4の割合である。

## Ⅲ. 成績

### 1. 腸内フローラの構成

腸内フローラの構成における普通食摂取後7日目、普通食にヨーグルト摂取7日目と14日目、および普通食摂取後7日目の結果をTable 3に10名の平均値の菌数の対数±標準偏差で示した。ビフィズス菌の菌数はヨーグルト摂取中有意（7日目 $p<0.05$ 、14日目 $p<0.01$ ）に増加し、乳酸桿菌も摂取14日目に有意（ $p<0.05$ ）に増加した。これに対して、レシチナーゼ陽性クロストリジウムはヨーグルト摂取中有意（ $p<0.05$ ）に減少し、緑膿菌も摂取14日目に有意（ $p<0.05$ ）に減少した。また、レシチナーゼ陽性クロストリジウムおよび緑膿菌は検出率において、摂取7日目には低下傾向を示し、14日目には有意に低下した。

**Table 3 Effect of yoghurt consumption on fecal flora of 10 human volunteers**

Organism	Before intake day 0	During consumption		After intake day 7
		day 7	day 14	
Total anaerobic bacteria	10.74 ± 0.18 (100).	10.70 ± 0.11 (100).	10.84 ± 0.06 (100).	10.71 ± 0.28 (100).
Bifidobacteria	9.95 ± 0.19 (100).	10.22 ± 0.14*	10.31 ± 0.17**	9.92 ± 0.29 (100).
Bacteroidaceae	10.56 ± 0.22 (100).	10.36 ± 0.18 (100).	10.53 ± 0.15 (100).	10.52 ± 0.32 (100).
Eubacteria	9.56 ± 0.46 (100).	9.52 ± 0.49 (100).	9.86 ± 0.18 (100).	9.69 ± 0.35 (100).
Peptococcaceae	8.67 ± 0.75 (90).	9.25 ± 0.48 (90).	8.97 ± 0.63 (80).	8.80 ± 0.64 (90).
Clostridia				
Lecithinase-positive	4.89 ± 1.69 (80).	2.97 ± 0.41*	2.89 ± 0.30*	3.94 ± 1.29 (70).
Lecithinase-negative	7.22 ± 1.89 (60).	7.05 ± 1.44 (30).	7.37 ± 0.93 (20).	6.94 ± 0.53 (40).
Lactobacilli	5.97 ± 1.89 (100).	7.58 ± 1.50 (100).	8.26 ± 0.82*	4.69 ± 1.43 (100).
Enterobacteriaceae	8.08 ± 0.49 (100).	8.01 ± 0.75 (100).	8.12 ± 0.96 (100).	8.16 ± 0.69 (100).
Pseudomonas	3.91 ± 0.43 (70).	3.76 ± 0.27 (40).	2.83 ± 0.20** (30).	4.09 ± 0.63 (70).
Streptococci	7.30 ± 1.16 (100).	7.07 ± 1.99 (100).	7.98 ± 1.14 (100).	7.18 ± 1.49 (100).
Staphylococci	4.24 ± 1.21 (70).	3.72 ± 0.87 (80).	3.48 ± 0.72 (80).	3.84 ± 0.51 (60).
Bacilli	3.27 ± 1.36 (70).	2.73 ± 0.60 (70).	3.18 ± 0.40 (70).	3.10 ± 0.20 (60).
Yeasts	3.65 ± 0.82 (70).	3.07 ± 0.34 (70).	3.08 ± 0.56 (70).	4.12 ± 0.73 (60).

\* Bacterial counts expressed as mean ± SD of log 10 number per gram of stool.

\*\* Figures in parentheses are frequency of occurrence (%).

\*\*\* Significant difference from the concentrations before intake: \*\*P < 0.01, \*P < 0.05.

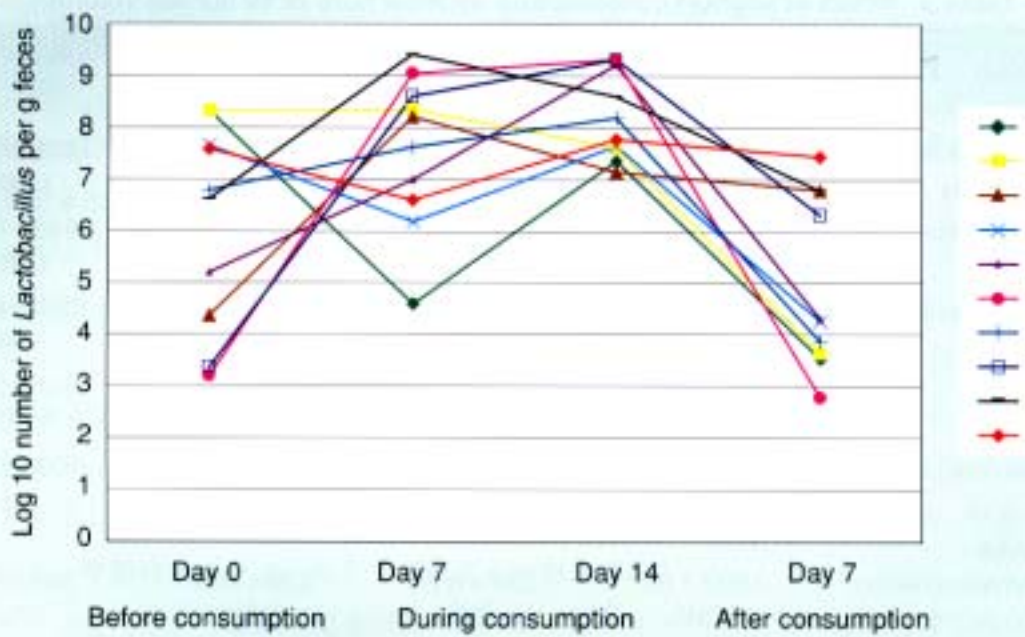


Fig.1 Change in the levels of *Lactobacillus* during yorghurt consumption by 10 human volunteers

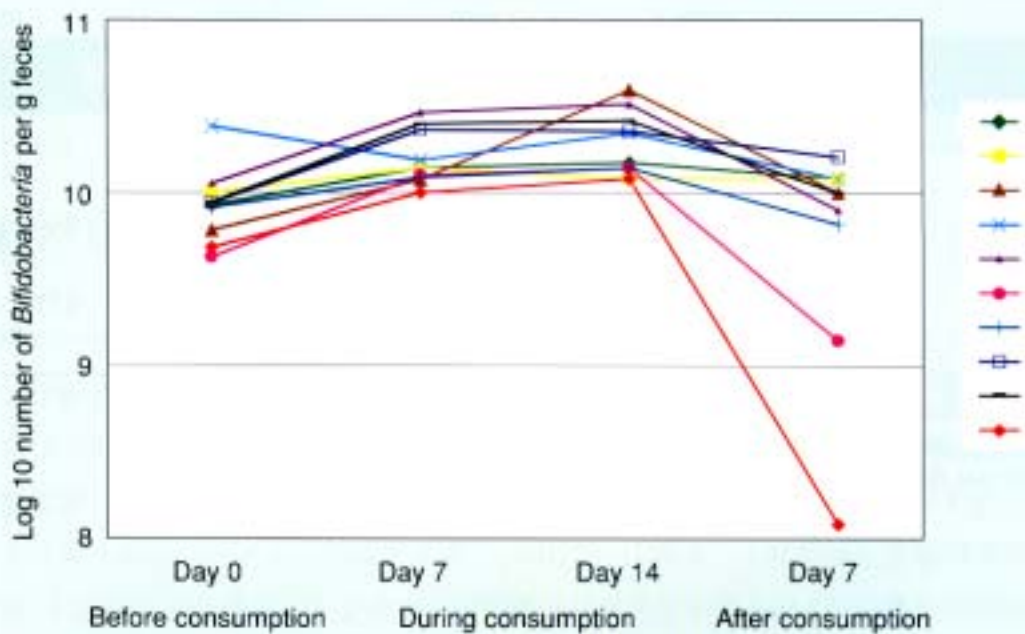


Fig.2 Change in the levels of *Bifidobacterium* during yorghurt consumption by 10 human volunteers

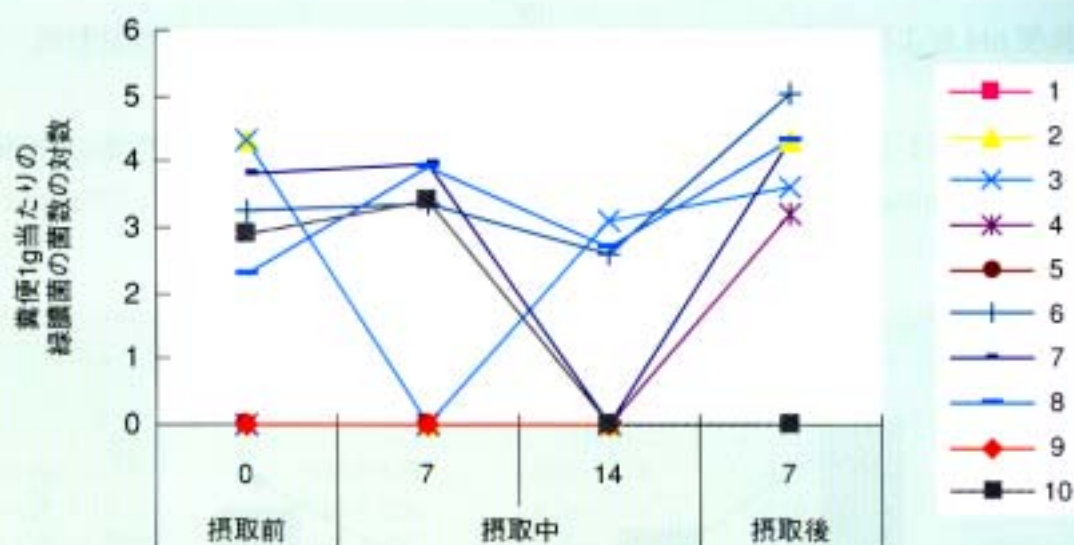


Fig.3 10ボランティアにおける緑膿菌の糞便レベルのヨーグルトの摂取効果

## 2. 腐敗産物

Table 4 に示すように、アンモニアはヨーグルト摂取中有意（7日目 $p < 0.05$ 、14日目 $p < 0.01$ ）に減少し、硫化物も摂取14日目に有意（ $p < 0.05$ ）に減少した。

インドールはヨーグルト摂取中有意（ $p < 0.05$ ）に減少した。フェノール、クレゾールとエチルフェノールはヨーグルト摂取14日目に有意（ $p < 0.05$ ）に減少した。

Table 4 Effect of yoghurt consumption on fecal ammonia, putrefacitive products, sulfide, fecal pH and water

	Before intake day 0	During consumption		After intake day 7
		day 7	day 14	
Ammonia ( $\mu\text{g/g}$ )	430 ± 184	258 ± 77*	193 ± 33**	289 ± 10
Sulfide ( $\mu\text{g/g}$ )	1.0 ± 0.4	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2*	0.8 ± 0.5
Phenol	4.22 ± 2.85	1.37 ± 0.89	0.99 ± 0.73*	3.84 ± 2.42
p-Cresol	15.72 ± 12.48	14.21 ± 6.95	9.09 ± 5.88	17.38 ± 10.05
Ethylphenol	3.48 ± 2.61	2.94 ± 2.82	0.14 ± 0.09*	2.84 ± 1.86
Indole	21.98 ± 11.85	11.19 ± 4.69*	10.96 ± 8.43*	25.11 ± 23.34
Skatol	10.21 ± 8.8	14.19 ± 10.55	11.89 ± 10.88	11.12 ± 10.32
pH	6.5 ± 0.4	6.2 ± 0.7	6.2 ± 0.6	6.6 ± 0.6
Water content	76.9 ± 6.9	78.8 ± 5.8	79.2 ± 6.5	76.4 ± 4.8

\* Putrefacitive products expressed as mean ± SD of  $\mu\text{g/g}$  wet feces

\*\* Statistically significant at \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  levels when compared with the values before intake.

### 3. 糞便pHおよび水分

Table 4 に示すように、糞便pHはヨーグルト摂取前に比べて摂取中0.3低下した。水分は摂取前に比べわずかに増加した。

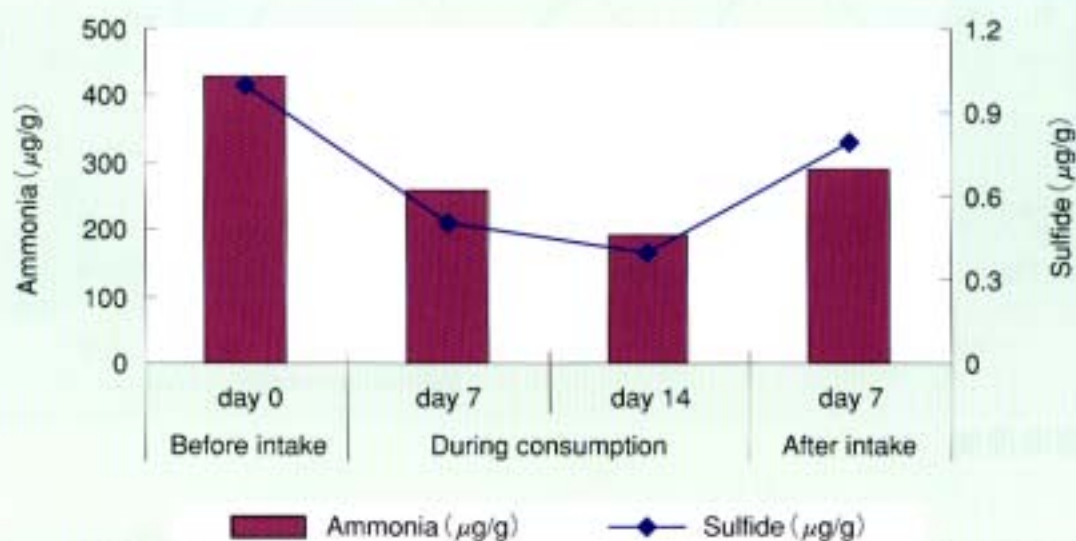


Fig.4 Change of yoghurt consumption on fecal ammonia and sulfide of 8 human volunteers

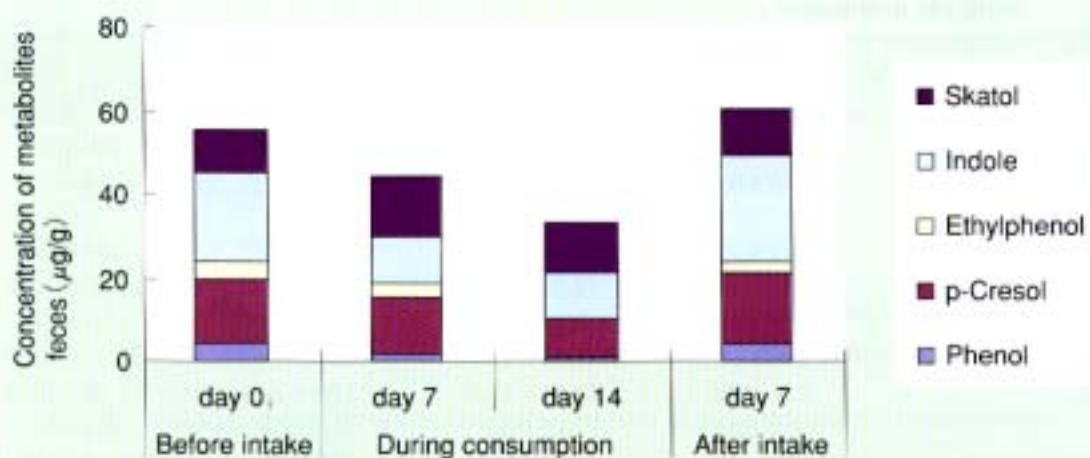


Fig.5 Changes in the concentrations of fecal metabolites during yoghurt intake



#### 4. 糞便短鎖脂肪酸

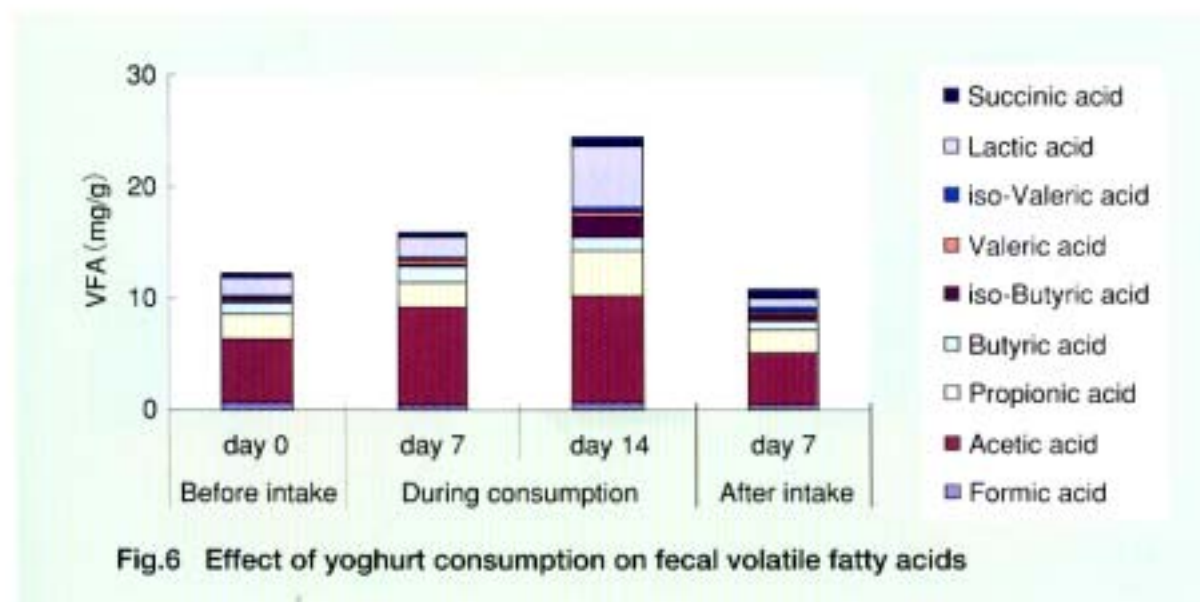
糞便短鎖脂肪酸はTable 5 に示すように、酢酸はヨーグルト摂取中有意（7日目 $p < 0.05$ 、14日目 $p < 0.01$ ）に増加し、プロピオン酸および乳酸は摂取14日目に有意（ $p < 0.05$ ）に増加した。

**Table 5** Effect of yoghurt consumption on fecal volatile fatty acids

	Before intake	During consumption		After intake
	day 0	day 7	day 14	day 7
Formic acid	0.56 ± 0.43	0.51 ± 0.74	0.57 ± 0.88	0.45 ± 0.48
Acetic acid	5.84 ± 2.86	8.59 ± 3.29*	9.66 ± 2.88**	4.66 ± 1.45
Propionic acid	2.23 ± 0.98	2.35 ± 1.05	4.12 ± 1.68*	2.03 ± 0.89
Butyric acid	0.94 ± 0.52	1.35 ± 0.76	1.22 ± 0.53	0.85 ± 0.55
iso-Butyric acid	0.28 ± 0.21	0.34 ± 0.21	1.87 ± 1.67	0.51 ± 0.29
Valeric acid	0.21 ± 0.07	0.36 ± 0.18	0.37 ± 0.13	0.22 ± 0.09
iso-Valeric acid	0.15 ± 0.08	0.22 ± 0.11	0.41 ± 0.27	0.47 ± 0.25
Lactic acid	1.57 ± 1.35	1.71 ± 1.17	5.39 ± 2.70*	0.91 ± 0.61
Succinic acid	0.37 ± 0.17	0.41 ± 0.31	0.78 ± 0.50	0.67 ± 0.56

\* Metabolic products expressed as mean ± SD of mg/g wet feces

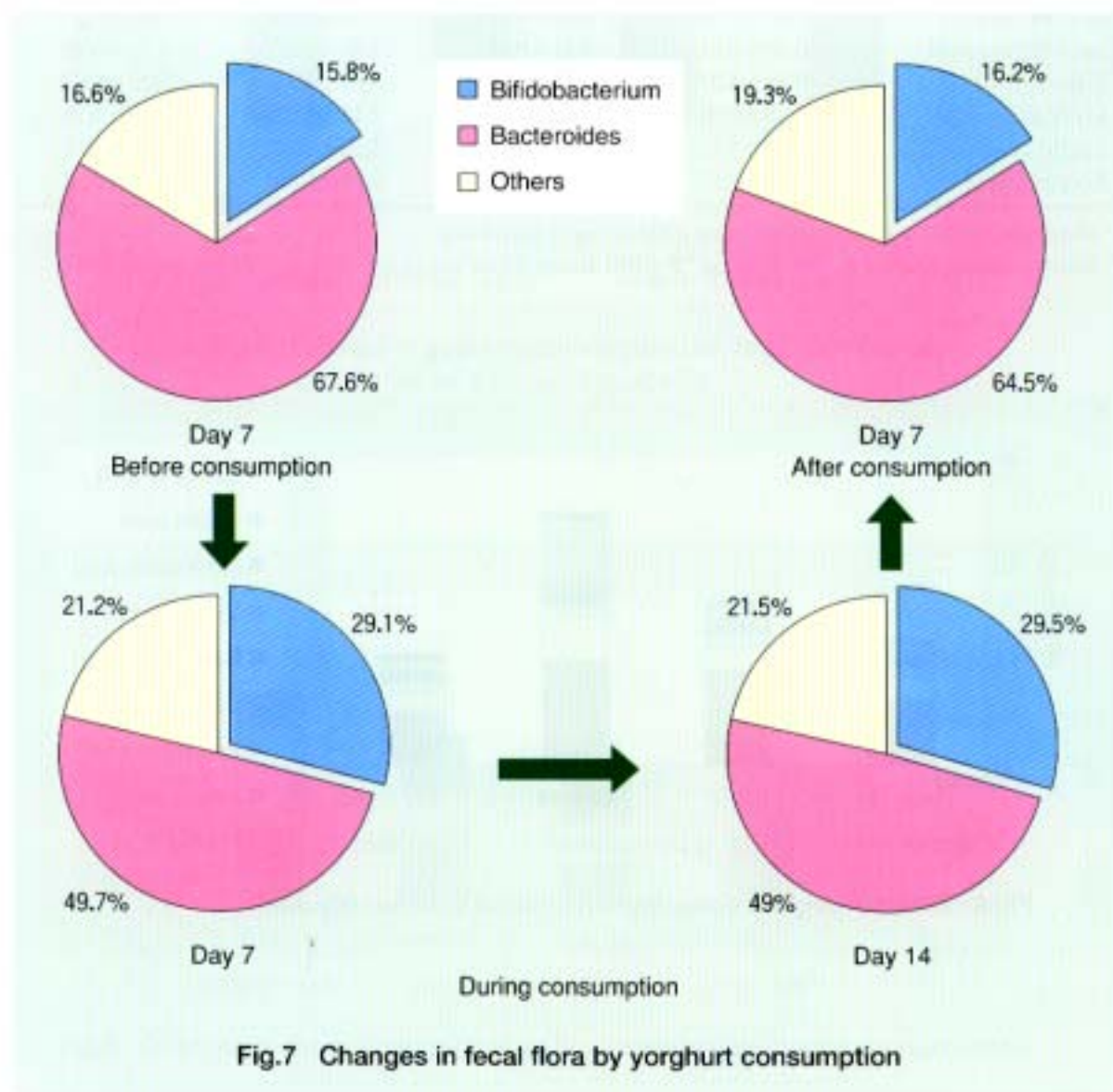
\*\* Statistically significant at \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  levels when compared with the values before intake.



## IV. 考 察

機能性食品およびその成分は免疫、内分泌、神経、循環および消化システムを改善して健康を増進させる。それらは作用のメカニズムからプロバイオテックス、プレバイオテックス、バイोजェニックスの3つに分けられる。

他方、人の腸内には100種類100兆個の微生物が棲息し、人によって遺伝子的にそれぞれの菌数のバランスが保たれ、その菌叢が体を守っている。腸内フローラの宿主に及ぼす影響はビフィズス菌や乳酸桿菌などの有用菌の作用とクロストリジウムや大腸菌などの有害菌による作用が考えられる。従って、食品やその成分などの摂取によって菌叢は変動するが、摂取をやめ



れば元の遺伝子的に維持されている菌叢に戻る。一般的に成人のビフィズス菌の割合は10%前後であるが、ヨーグルトなどの摂取で25%前後までに増加し、摂取を中止すれば10%位に戻る。

*Lactobacillus casei* 菌は15℃の低温と45℃の高温で発育するホモ発酵性乳酸菌で、人の腸管から低率（30%）に検出される。田中ら<sup>21</sup>（1994）は5名の健康成人に*L. casei* 菌を毎日 $10^{10}$  cfu/gを飲用させ、この菌の回収は $10^{7-8}$  cfu/gで、飲用中止後1週以内に消失すると報告している。Saxelinら（1991）<sup>9</sup>は7名の健康成人に*L. casei* strain GGを $1.5 \times 10^{11}$  cfu/日摂取させると、このGGは $10^{6-7}$  cfu/gの割合で回収されたと報告されている。本実験では*L. casei* N-1  $10^{10}$  cfu/g菌を300 g/日摂取させると、 $10^{6-7}$  cfu/g検出され、Saxelinらの報告に類似した。

乳酸菌使用ヨーグルトの摂取における腸内菌に対する影響は*L. casei*<sup>22</sup>、*L. rhamnosus* (*L. casei* strain GG)<sup>5</sup>、*L. plantarum*<sup>23</sup>、*L. bulgricus*・*Streptococcus thermophilus*の2種<sup>22,23</sup>、*L. Bulgricus*・*S. thermophilus*に*L. gasseri*<sup>15</sup> または *Bifidobacterium lactis*<sup>6</sup> の添加の3種、さらに、*L. acidophilus*と*B. longum*の添加の4種<sup>16</sup>、*L. helveticus*・*L. acidophilus*・*B. bifidum*・*S. thermophilus*の4種におけるヨーグルトの報告がある。

*L. casei* N-1 使用ヨーグルト摂取において、ビフィズス菌が増加し、多くの報告と類似したが、レシチナーゼ陽性クロストリジウムの減少についてはTakumiら<sup>10</sup>の乳果オリゴ糖添加冷凍ヨーグルトの報告と同様であった。本ヨーグルト摂取における*Pseudomonas*の減少は抗菌グッズなどの使用拡大傾向と考えられる。

本ヨーグルト摂取によるアンモニアの低下は勝野ら<sup>13</sup>や田中ら<sup>21</sup>の報告と類似し、硫化物の減少は原ら<sup>3</sup>の報告と同様であった。また、インドールは寺田ら<sup>16</sup>の報告と同様に全ボラソニアで減少した。フェノールおよびクレゾールの減少は原ら<sup>3</sup>の報告に類似した。

本ヨーグルト摂取における短鎖脂肪酸の酢酸、プロピオン酸、乳酸の増加はTakumiら<sup>10</sup>の報告と類似し、これは有用菌のビフィズス菌や乳酸桿菌の増加によるものと思われる。

以上より、本ヨーグルト摂取は腸内フローラと腸内代謝の活性によって、腸内環境の改善と大便の脱臭効果が明らかにされた。

## 文 献

- 1) 久米村恵ら：2001、腸内細菌学雑誌、15、15-20.
- 2) 田中隆一朗ら：1994、腸内フローラと食餌、p85-104、学会出版センター
- 3) 原宏佳ら：1993、ピフィズス、6、169-175.
- 4) Hara, H.ら：1994、Bifidobacterium Microflora, 13、51-63.
- 5) 細田正孝ら：1994、ピフィズス、8、21-28.
- 6) 松本光晴ら：2001、腸内細菌学雑誌、14、97-102.
- 7) Mitsuoka, T.：2000、Biosci. Microflora, 19, 15-25.
- 8) Mitsuoka, T.ら：1965、Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. A195, 455-469
- 9) Saxelin, M et al.：1991、Microb. Ecol. Health Dis. 4, 209-214.
- 10) Takumi, H.ら：2001、日本食品微生物学会雑誌、18、49-56.
- 11) Terada, A.ら：1994、Bifidobacterium Microflora, 13、29-32.
- 12) Terada, A.：1995、Microb. Ecol. Health Dis. 8, 15-21.
- 13) 勝野真也ら：2003、腸内細菌学雑誌、17、15-25.
- 14) 瀧口隆一ら：1997、腸内細菌学雑誌、11、19-24.
- 15) 絹巻明生ら：2001、日本乳酸菌学会誌、12、92-101.
- 16) 寺田厚ら：1993、食品と微生物、10、29-34