

Studies on Bifidobacterium II.Effects of Administration of Bifidobacterium and a New Growth Factor for Bifidobacterium on the Human Fecal Flora

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7827

Bifidobacterium に関する研究

II. *Bifidobacterium* およびその新しい増殖因子の経口投与による ヒト腸内細菌叢に対する影響

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

田 中 隆 一 郎

(昭和60年10月15日受付)

新しい *Bifidobacterium* の増殖因子である転移ガラクトオリゴ糖 (TOS) の *in vitro* での発酵性を49菌種65株を用いて最初にしらべ、次に、健康人16例を対象に *Bifidobacterium breve* 4006 と TOS の投与による大便菌叢に対する影響を検討した。*Bifidobacterium* の8株は全て TOS をよく分解したが、他方、*Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* 及び *Enterobacteriaceae* からなる19菌種にも発酵が認められた。TOS を1日あたり3gまたは10g 1週間投与することにより、投与菌 *B. breve* 4006 および常在 *Bifidobacterium* の両方が増加することが判った。*B. breve* 4006 と TOS の併用投与により *Bacteroidaceae* と *Enterobacteriaceae* が抑制され、大便のアンモニア含量と尿中インディカンの排泄量も低下した。これらの結果から TOS は *in vitro* のみならず *in vivo* でも有効な新しい *Bifidobacterium* の増殖因子であると結論された。

Key words Bifidus-growth factor, transgalactosylated oligosaccharide (TOS), *Bifidobacterium breve* 4006, fecal flora, ammonia and indican excretion.

母乳栄養児が人工栄養児に比し罹患率と死亡率の低いことが明らかとなっている¹⁾²⁾。母乳中には各種の感染抵抗因子が存在することは既に知られているが、中でも分泌型IgAを初めとする免疫抗体と共に、古くから“ビフィズス因子”の存在が重要視されてきた³⁾⁴⁾。この“ビフィズス因子”の存在により、母乳栄養児と人工栄養児の腸内細菌叢には顕著な差が認められる。母乳栄養児の大便1g中には *Bifidobacterium* が 10^{10-11} のレベルでほぼ純培養のように存在するが、人工栄養児では *Bifidobacterium* のみならず *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* 等が同じような比率で存在し混合菌叢を形成している⁴⁾⁵⁾。母乳栄養児の *Bifidobacterium* フローラの存在意義⁶⁾が明らかになるにつれて、人工栄養児に対しても *Bifidobacterium* フローラの形成の試みが多くなされてきた。“ビフィズス因子”あるいは *Bifidobacterium* の直接的な経口投与がその主たる方法であ

る。今日、“ビフィズス因子”として報告されているものはN-アセチル-D-グリコサミン⁸⁾、ラクチュロース⁹⁾¹⁰⁾、パンテチン¹¹⁾、カゼインの加水分解物¹²⁾、オリゴ糖¹³⁾などである。しかしながら、“ビフィズス因子”として報告されてきた多くは単に *in vitro* でのみ増殖促進効果を認めるに過ぎず、*in vivo* での有効性に関しては不明ないし不満足な結果しか得られていない¹⁴⁾¹⁵⁾。

著者の研究所では乳糖に対し *Aspergillus oryzae* のβ-ガラクトシダーゼを作用させたものの中に主として *Bifidobacterium* の発育を促進する画分があること、且つこの画分は転移ガラクトオリゴ糖 (transgalactosylated oligosaccharide, TOS) であることを明らかにしている。本研究で著者は各種菌株の TOS に対する分解能を検討すると共に、TOS を *Bifidobacterium* と共に人体に経口投与し、*in vivo* における *Bifidobacterium* に対する増殖促進効果の有無を前報¹⁶⁾の MPSN 選択培地を用いて検討した。

Abbreviations: TOS, transgalactosylated oligosaccharide.

材料と方法

I. TOS の調製

TOS は黒田らの方法¹⁷⁾により調製したものをを用いた。すなわち、3.6 kg の乳糖を 6 l の 37°C にした蒸留水に溶解し、1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) 50 ml と β -ガラクトシダーゼ (ラクターゼヤクルト、ヤクルト本社) 10 万単位および蒸留水を加えて 10 l とし 37°C 5 時間反応させた。ついで反応液を 100°C、10 分加熱し、変性蛋白質を濾別後、陽イオン交換樹脂 (ダイヤイオン SK1B, 三菱化成) と陰イオン交換樹脂 (ダイヤイオン PA 316, 三菱化成) のカラムを通した。通過液を活性炭カラムに一晩接触させ、その後活性炭を脱イオン水で水洗して単糖類を溶出し、さらに 5% エタノール、50% エタノール各 60 l で溶出した。この 50% エタノール溶出区分を濃縮し、メンブレンフィルターで無菌濾過後、再度イオン交換して透明な液を得た。これを減圧濃縮して 2.5 l の粘稠な液を得、再度メンブレンフィルターで濾過し、濾液を凍結乾燥して白色の粉末 500 g を得た。このように調製した TOS は吸湿防止に注意し冷蔵保存した。TOS の推定構造式とその組成を表 1 に示した。

II. 使用菌株

Bifidobacterium として標準株 8 株および著者が母乳栄養児から分離した研究室保存株 *B. breve* 4006 の計 9 株を用いた。また、*B. breve* 4006 株は常在の *Bifidobacterium* と区別するために、ストレプトマイシン、ネオマイシンに対し各々 3000 μ g/ml, 1000 μ g/ml の耐性マーカーを付与した。標準株は *B. bifidum* E319, *B. infantis* S12, *B. infantis* subsp. *lactentis* 659, *B. infantis* subsp. *liberorum* S76e, *B. breve* S1, *B. breve* subsp. *parvulorum* a S50, *B. adolescentis* a E194a, *B. longum* E194b である。*Bifidobacterium* 属以外の使用菌株は 7 菌属、42 菌種合計 57 株であった。

III. TOS の分解試験

被験菌株を前報¹⁶⁾の如く MVL-G 液体培地で 24-48 時間培養後、希釈液で 2 回集菌洗浄し、1% TOS 加 MVL 液体培地に 10% の割合で接種し 37°C 5 日間培養した。対照培地として無糖 MVL 培地、乳糖 1% 加 MVL 培地を用いた。糖分解は pH 指示薬として 16 ppm の割でブロムクレゾールパープルを添加し、培地の黄変を指標とした。また、分解活性は 24 時間以内に黄変したもの、(卅); 2-3 日で黄変したもの、(+); 4-5 日で黄変したもの、(+); 5 日以内で黄変しないもの、(-) のように記した。

IV. 使用培地

腸内細菌叢の分析のために、総菌数の測定には非選

Table 1. Structure of transgalactosylated oligosaccharide (TOS)

Galactose	—X—	(Galactose) _n	—Y—	Glucose
Linkage:				
n=1-4				
X=-1, 6; -1, 4; -1, 3				
Y=-1, 4; -1, 3; -1, 6				
Composition:				
Trisaccharides, 55%				
Tetrasaccharides, 33%				
Pento- and hexasaccharides, 12%				

The methods for preparation and purification of TOS were described in the Japanese Patent Publication Nos. (104885, 1980).

択の MVL-G 培地¹⁸⁾を用い、*Bacteroidaceae* と *Bifidobacterium* および *Clostridium perfringens* の測定培地は各々、バンコマイシン 80 μ g/ml, カナマイシン 1 μ g/ml 加 MVL-G 培地, MPSN 培地¹⁶⁾および CM 培地 (白水) を用いた。また、投与菌 *B. breve* 4006 の回収にはストレプトマイシン、ネオマイシン各 3000 μ g/ml, 1000 μ g/ml 加 MPSN 寒天培地を用いた。上記の培地に関しては前報¹⁶⁾で記載した厳密な嫌気条件が保持できるロールチューブ法を用いて作成した。また、*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* 及び *Staphylococcus* の菌数測定は各々マッコンキー培地 (白水), KMN, スタフィロ No. 110 (白水) の各培地を用いた。

V. 経口投与実験

1. 対象

健康な成人男子 16 例 (25-35 才) を対象とした。対象者はいずれも本研究の開始 3 週間前から実験期間中を通して薬物の投与を受けておらず、またミルク製品および *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* を含有するヨーグルト等の摂取を禁じた。

2. 投与スケジュール

対象者を 3 群に分けた。すなわち I 群は単独投与群 (n=5) であり、投与前対照区 1 週につづき、TOS を 1 日あたり 3g 投与を 1 週、10g 投与を 1 週とした。II 群は *B. breve* 4006 単独投与群 (n=6) であり、投与前対照区 1 週後 *B. breve* 4006 を 1 日あたり 10⁸個連続 3 週間投与した。また、III 群は、*B. breve* 4006 と TOS の併用投与群 (n=5) であり、投与前対照区 1 週後、*B. breve* 4006 を 1 日あたり 10⁸個単独投与を 1 週、つづいて *B. breve* 4006 と TOS を 1 日あたり各々

10⁹個と3g併用を1週, TOSを10gに増加して併用投与を1週, 投与後対照区を1週とした。投与菌は凍結乾燥菌末(1gあたり2~5×10⁹の生菌数含有)を用い微温湯に溶解して, 試験期間中は毎日昼食後に飲用した。TOSの飲用も同様の方法で行った。

3. 腸内細菌叢の分析

大便菌叢の検査は新鮮便1g(湿重量)を用い試験期間中は週3回の割で行った。前述のような非選択および各種選択培地を用いて, 総菌数, *Bacteroidaceae*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*は各々3, 2, 5, 1日培養を行い, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*は各々1, 2, 2日間好気培養を行った。また, *Lactobacillus*は3日間嫌気ジャー法を用いて炭酸ガス置換培養を行った。なお, 培養温度はすべて37°Cであった。

4. 大便のアンモニアと尿中インディカンの測定

腸内腐敗代謝産物の産生の指標として大便のアンモニアと尿中インディカンの排泄量を測定した。大便のアンモニア含量は新鮮排泄便を攪拌して均質化し, その0.5~1.0gを除蛋白液(タングステン酸一硫酸)で速やかに10倍に希釈, 2000xg, 20分遠心後上清0.1mlをとり市販の血中アンモニア測定キット(和光)を用い常法のごとく37°C, 30分間発色させて分光光度計(日立モデル100-60, 日立)によりOD_{630nm}を測定した。尿中インディカン含量は40~50倍に蒸留水で希釈した初尿5mlに1%K₂S₂O₈溶液0.5mlおよび1%チモールアルコール0.5mlを加えて混合後, 25%トリクロロ酢酸一塩酸5mlを加えて室温で15分間放置した。その後, 正確に98°C20分間加熱し放冷後上層を除去し, さらに氷酢酸3.5mlを加えて混合しOD_{640nm}を測定した。盲検はチモールアルコールのかわりに95%エチルアルコールを加えて試料と同一条件で処理したものをを用いて測定した。

VI. 統計学的処理

大便中の各種菌数の増減についてpaired-t検定を行い, P<0.05を有意差ありと判定した。

成 績

I. TOSの分解

TOSは*Bifidobacterium*によって最もよく分解され, 表2に示すごとく8株全株が24時間以内に明らかな酸産生を認めた。また, *Bacteroides* 5株全株, *Enterobacteriaceae* 6株中5株, *Lactobacillus* 14株中8株, *Streptococcus* 14株中5株, *Clostridium* 8株中1株にも酸産生が認められた。以上の結果から, *in vitro*でのTOSの利用能は*Bifidobacterium*が最も強いが, *Bacteroides*, *Lactobacillus*および*Enterobacteriaceae*の菌株中には*Bifidobacterium*と同程度の利用能をもつ菌株が存在することが判った。

II. 腸内細菌叢の変化

1. *Bifidobacterium*

I群で10g/日のTOSを毎日飲用した期間中の*Bifidobacterium*の菌数(3回測定の平均値)は, 投与前対照区に比して5例中4例が増加した。II群では1日あたり3.0×10⁹個(平均)の*B. breve* 4006を連続3週間飲用させたが, 常在*Bifidobacterium*の菌数には明らかな変化はなかった。また, 投与菌*B. breve* 4006は平均10^{6.6}/gのレベルで回収された。III群では*B. breve* 4006のみを1週間連続飲用させた期間中に平均10^{7.5}/gの回収をみたが, さらにTOSを3g, 10g/日, 各々1週間ずつ併用することにより, 投与菌の回収量はそれぞれ平均10^{7.84}/g, 10^{8.19}/gのように増加し検定の結果有意であった(P<0.05)。また, 投与菌の回収量が増加するに伴い, 先住*Bifidobacterium*が投与前対照区に比して有意に低下した(P<0.05)(図1)。

2. *Bacteroidaceae*および*Enterobacteriaceae*

Table 2. Utilization of TOS by *Bifidobacterium* and other strict or facultative anaerobes

Genus	No. of species	No. of strains tested	No. of strains showing reaction of			
			‡*	‡	+	-
<i>Bifidobacterium</i>	7	8	8	0	0	0
<i>Bacteroides</i>	4	5	2	0	3	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	4	6	4	0	1	1
<i>Lactobacillus</i>	8	14	4	4	0	6
<i>Streptococcus</i>	8	14	0	3	2	9
<i>Clostridium</i>	8	8	0	0	1	7
<i>Fusobacterium</i>	3	3	0	0	0	3
<i>Eubacterium</i>	6	6	0	0	0	6
<i>Staphylococcus</i>	1	1	0	0	0	1

* Acid production from TOS: ‡, within 1 day; ‡, 2-3 days; +, 4-5 days; -, negative.

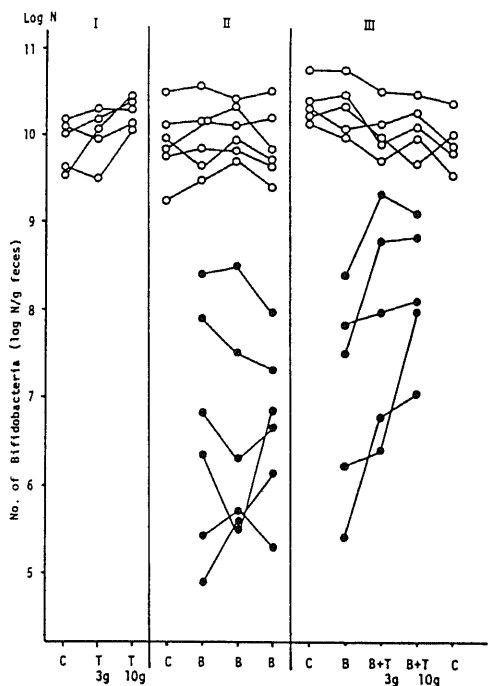


Fig. 1. Effects of TOS and/or *B. breve* 4006 administration on fecal *Bifidobacterium* in healthy subjects

Assay of fecal flora was performed on three stool samples per individuals in a week during the periods of non administration (C), the administration of TOS (T), *B. breve* 4006 (B), and *B. breve* 4006 and TOS (B+T). Each plot expresses mean value of the numbers of *Bifidobacterium* per gram in three stool samples. ●, *B. breve* 4006; ○, resident *Bifidobacterium*. I, TOS administration group; II, *B. Breve* 4006 administration group; III, *B. Breve* 4006 and TOS administration group.

I群のTOSを10g/日1週間連日飲用期間中およびII群の*B. breve* 4006投与の第2週, 第3週の*Bacteroidaceae*の菌数はそれぞれ投与前対照期に比して有意の低下を認めた ($P < 0.05$). 一方, III群においても*B. breve* 4006とTOSを各々3g, 10g/日それぞれ1週間併用飲用期間中に,*Bacteroidaceae*の菌数は各々平均 $10^{9.91}$, $10^{9.96}$ /gとなり投与前対照区の平均 $10^{10.30}$ /gに対し低下し検定の結果も有意であった ($P < 0.05$) (図2).

また *Enterobacteriaceae* の菌数もIII群の*B. breve* 4006とTOS (3g, 10g/日)の併用期に有意の低下を示し ($P < 0.05$), 投与前対照区の平均 $10^{7.60}$ /gから3g, 10g/日併用期には各々平均 $10^{6.44}$, $10^{6.49}$ /gの菌数に

なった (図3).

3. 総菌数および *Lactobacillus*

III群の*B. breve* 4006とTOS 3g, 10gの各併用期に総菌数の有意の低下を認めた ($P < 0.05$). また, その菌数は投与前対照区平均 $10^{10.76}$ /gから, 3g, 10g併用期には各々平均 $10^{10.54}$, $10^{10.54}$ /gのように低下した.

一方, I群ではTOSを10g/日1週間飲用期間中に*Lactobacillus*の菌数が投与前対照区に比して有意に増加し ($P < 0.05$), 平均値もそれぞれ $10^{6.72}$ /gから $10^{6.63}$ /gのように増加した.

4. *Clostridium*, *Streptococcus* および *Staphylococcus*

これらの菌群の菌数はいずれの試験群においても有意の菌数の変化は認められなかった.

III. 大便のアンモニアおよび尿中インディカン

図4に示すように大便のアンモニア含量はIII群の*B. breve* 4006とTOS (3g, 10g)併用飲用により, 投与前対照区に比し5例中4例が低下し, 平均値も各々 $426.58 \mu\text{g}$ から $173.78 \mu\text{g}$, $154.88 \mu\text{g/g}$ のように低下した. 尿中インディカンもIII群の*B. breve* 4006とTOS (3g, 10g)併用飲用により, 投与前対照区に比し有意に低下した ($P < 0.05$). 平均値も各々 26.30 mg から 21.38 mg , 19.05 mg/100 ml 早朝尿, のように低下した (図5).

考 察

ヒト大腸内では*Bifidobacterium*を含めて殆どの細菌が難消化性の植物多糖や未吸収のスターチ, あるいは大腸で分泌される粘液多糖 (ムチン等)などの炭水化物を主要なエネルギー源としている²¹⁾. また, これらの炭水化物から短鎖の脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸が主である), 炭酸ガス, 水素, メタン, 水などを嫌気性菌主体の嫌気発酵で産生している²¹⁾. このような腸内細菌叢の自然の生態系としての理解が進歩すると共に, “ビフィズス因子”の研究も新しい展開をみせつつある. すなわち, *Bifidobacterium*の主要な生息部位である小腸下部から大腸に到達し, 且つ, *Bifidobacterium*の必須エネルギー源である糖質の中から, より特異性の高いものを探す方向である.

今回検討したTOSが難吸収性であることは野瀬ら²²⁾²³⁾の呼気中水素ガス分析法 (Hydrogen breath test)による糖質吸収能検査の結果から明らかにされており, 健康成人への経口負荷 (0.5g/kg) で非吸収性とされるラクチュロースと同様に水素ガスの検出を認めた. また, *in vitro*でヒト由来の*Bifidobacterium*の全菌種がTOSを強く分解したが, その他*Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*の一部にも同程度の

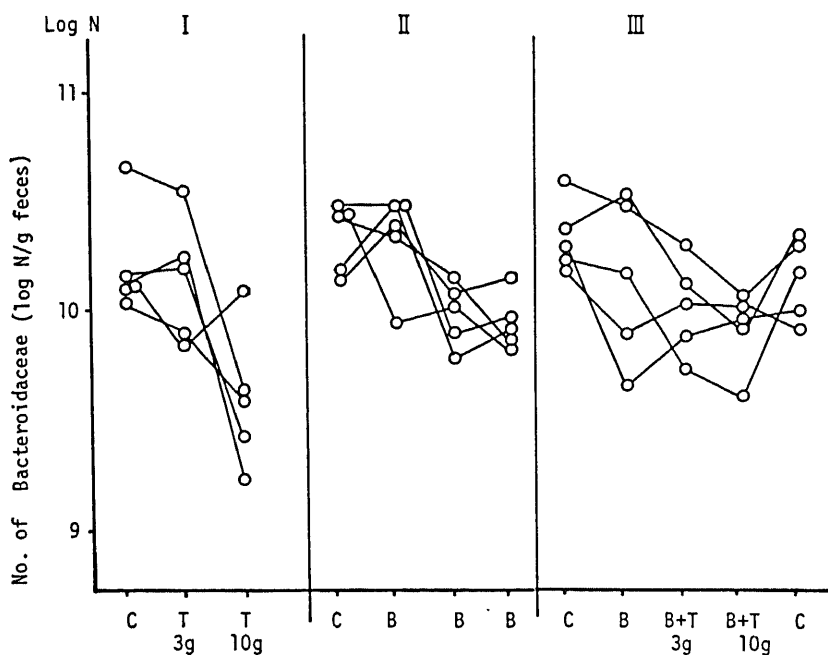


Fig. 2. Effects of TOS and/ or *B. breve* 4006 administration on fecal *Bacteroidaceae* in healthy subjects
Refer to the footnotes of Fig. 1.

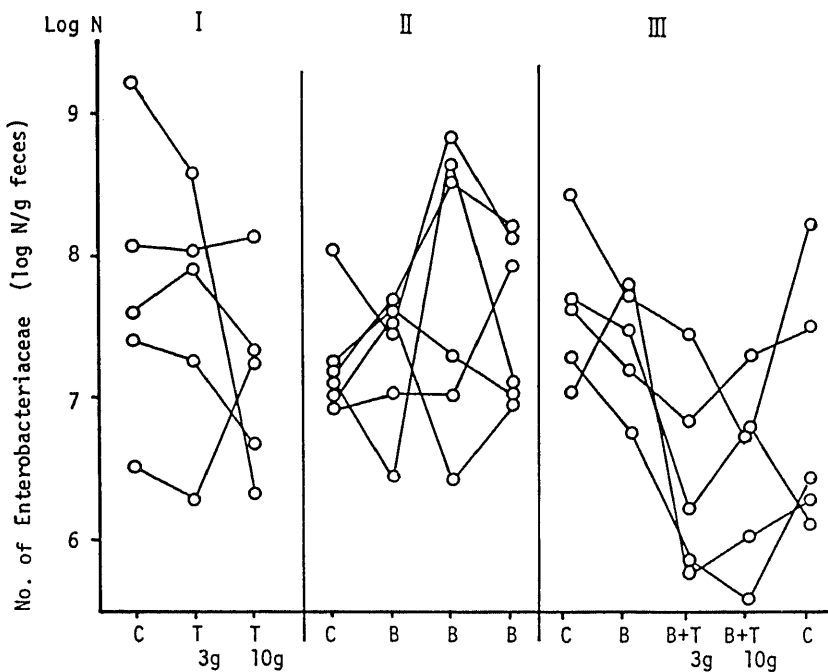


Fig. 3. Effects of TOS and/ or *B. breve* 4006 administration on fecal *Enterobacteriaceae* in healthy subjects
Refer to the footnotes of Fig. 1.

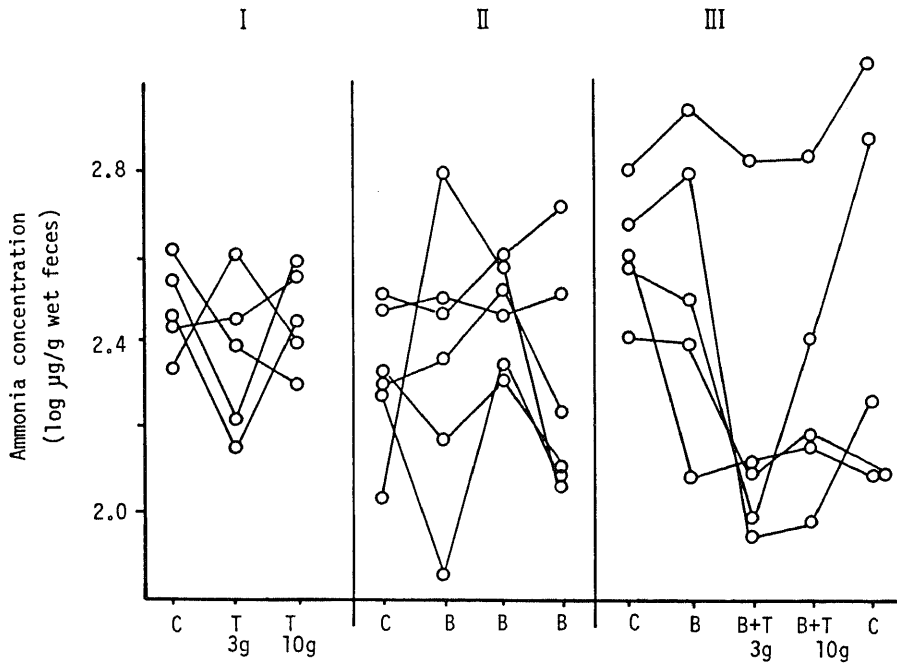


Fig. 4. Effects of TOS and/ or *B. breve* 4006 administration on fecal ammonia excretion Refer to the footnotet of Fig. 1.

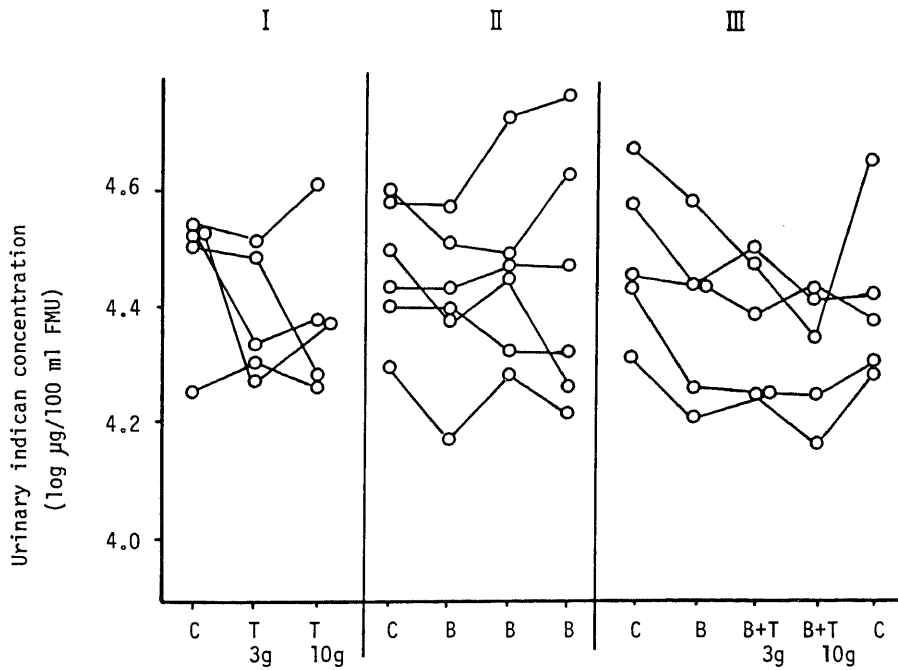


Fig. 5. Effects of TOS and/ or *B. breve* 4006 administration on urinary indican excretion Refer to Footnotes of Fig. 1. FMU, the first urine voided after rising.

分解能を有するものも認められた。これらの結果から、経口飲用された TOS は難吸収性の糖として下部消化管に到達し、且つ必ずしも特異性は高くないが *Bifidobacterium* にとって格好の基質となり得ることが強く示唆された。

一方、*in vivo* での健康成人に対する経口投与試験の結果から TOS 単独投与群 (I 群) では常在の *Bifidobacterium* と *Lactobacillus* の増加、*Bacteroidaceae* の減少を認めた。*B. breve* 4006 単独投与群 (II 群) では *Bacteroidaceae* の減少が認められた。また、*B. breve* 4006 と TOS の併用投与群 (III 群) では投与菌 *B. breve* 4006 の顕著な増加と共に総菌数、*Bacteroidaceae*、*Bifidobacterium*、*Enterobacteriaceae* の減少を認めた。TOS 飲用と *Bifidobacterium* の増殖促進効果との関係から、TOS のみを飲用した場合には常在の *Bifidobacterium* が増加するが、TOS と *B. breve* 4006 の併用飲用では投与菌 *B. breve* が優先的に増加し先住 *Bifidobacterium* が逆に抑制されることも判った。これらの結果から、TOS は常在の *Bifidobacterium* と投与菌の *B. breve* 4006 の双方の増殖促進効果を有するが、図 1 で明らかなように TOS の *in vivo* での分解活性は投与菌 *B. breve* の方が先住 *Bifidobacterium* よりも強いことが示唆された。この点について TOS の加水分解を担う *Bifidobacterium* の β -ガラクトシダーゼ活性を比較したところ、*B. breve* 4006 株は他の *B. bifidum*、*B. longum*、*B. adolescentis*、*B. infantis* 等の菌株に比して 2~7 倍以上その活性が高いことが判明した (松本ら、未発表)。

B. breve 4006 と TOS を併用飲用した III 群でグラム陰性菌 (*Bacteroidaceae* と *Enterobacteriaceae*) が減少することは、同時に測定した大便のアンモニアと尿中インディカンの排泄量の低下との関係を考える上で興味深い。すなわち、消化管内のアンモニアは *Bacteroides* や *Peptostreptococcus* 等の嫌気性菌による尿素の加水分解に由来するものが量的に主要なものであり²⁴⁾²⁵⁾、また、インドールの硫酸抱合体であるインディカンの産生に関与する菌群は *Bacteroides* や *E. coli* 等のグラム陰性菌が主要なものであるからである²⁶⁾。この *B. breve* 4006 と TOS の併用効果は動物実験でも明らかとなっている。無菌ラットにヒト成人の大便菌叢を定着させ *B. breve* 4006 と TOS を投与することにより、グラム陰性菌と尿中インディカンやフェノール類の低下が認められた²⁰⁾。

消化管内のアンモニアやインドールは腸内腐敗代謝産物の指標とみなされており、したがってこのことから *B. breve* 4006 と TOS の併用飲用は腸内環境の改善に有力な手段を提供するものと考えられる。

ところで、食餌と腸内細菌叢の関係については多くの議論がなされてきたが、今日では極端な食餌組成の変化でも容易に菌叢の変動は把握し難いことが共通の認識となっている²⁷⁾。しかしながら、今回の結果から腸内細菌叢の代謝活動の基本となる糖質を配慮することにより菌叢のコントロールが可能となりうることも示唆された。

以上、これらの成績は TOS が *in vitro* のみならず *in vivo* でも有効な *Bifidobacterium* の増殖促進物質であることを明らかにするものであり、新しい“ビフィズス因子”として十分有用且つ、評価しうものとする。本研究で明らかにした成績を基礎に今後は、人工栄養児に対する TOS の“ビフィズス因子”としての有効性の確認、ラクチュロースで有効性が示されている肝性脳症や便秘症等の改善²⁸⁾²⁹⁾についても比較臨床試験を進めて行きたい。

結 論

母乳栄養児から分離した *Bifidobacterium breve* 4006 と乳糖から調製した転移ガラクトオリゴ糖 (TOS) を健康成人に経口投与して、腸内細菌叢および大便のアンモニアと尿中インディカンの排泄量に対する影響をしらべ以下の結果を得た。

1. *in vitro* での TOS の分解性を検討し各種腸内菌として標準株を中心に 66 株をしらべた。*Bifidobacterium* の 7 species 8 株のすべては強い分解能を示した。また、*Bacteroides*、*Lactobacillus*、*Enterobacteriaceae*、*Streptococcus*、*Clostridium* にも分解能をもつものがあつたが、*Fusobacterium*、*Eubacterium*、*Propionibacterium*、*Staphylococcus* は分解しなかつた。

2. ヒトに対する経口投与と実験で TOS 単独投与群 ($n=5$) では、1 日あたり 10 g の TOS を毎日 1 週間飲用することにより常在の *Bifidobacterium* が 5 例中 4 例で増加し、*Lactobacillus* は有意に増加 ($P<0.05$) した。また、*Bacteroidaceae* は有意に低下 ($P<0.05$) した。

3. *B. breve* 4006 単独投与群 ($n=6$) では、1 日あたり 2~5 $\times 10^9$ を毎日 3 週間飲用することにより、飲用後第 2 週と第 3 週目に *Bacteroidaceae* の有意の低下 (各 $P<0.05$) を認めた。

4. *B. breve* 4006 と TOS 併用投与群 ($n=5$) では、1 日あたり 2~5 $\times 10^9$ の *B. breve* 4006 と TOS を 3 g または 10 g を毎日それぞれ 1 週間飲用することにより、投与菌 *B. breve* 4006 の有意の増加 (各 $P<0.05$) と共に総菌数、*Bacteroidaceae*、先住 *Bifidobacterium*、*Enterobacteriaceae* の有意な低下 ($P<$

0.05) を認めた。また同時に、大便のアンモニア含量が5例中4例で低下し、尿中インディカンは有意に減少 ($P < 0.05$) した。

以上の結果より、乳糖由来の転移ガラクトオリゴ糖 (TOS) は *in vitro* のみならず *in vivo* でも有効な新しい“ビフィズス因子”であると結論された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました西田尚紀教授に深甚の謝意を表します。また、貴重な御教示を賜りました中村信一助教授とヤクルト中央研究所務台方彦所長に深謝いたします。また、本研究の遂行にあたり御協力下さいましたヤクルト中央研究所所員各位に厚く御礼いたします。

文 献

- 1) Cunningham, A. S.: Morbidity in breast-fed and artificially-fed infants. *J. Pediatr.*, **90**, 726-729 (1977).
- 2) Cunningham, A. S.: Morbidity in breast-fed and artificially-fed infants II. *J. Pediatr.* **95**, 685-689 (1979).
- 3) Mata, L.: Breast-feeding: main promotor of infant health. *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 2058-2065 (1978).
- 4) Welsh, J. K. & May, J. T.: Anti-infective properties of breast milk. *J. Pediatr.*, **94**, 1-9 (1979).
- 5) Beerens, H., Romond, C. & Neut, C.: Influence of breast-feeding on the bifid flora of newborn intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2434-2439 (1980).
- 6) Stark, P. L. & Lee, A.: The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.*, **15**, 189-203 (1982).
- 7) Bullen, C. L. & Willis, A. T.: Resistance of the breast-fed infant to gastroenteritis. *Br. Med. J.*, **3**, 338-343 (1971).
- 8) György, P., Kuhn, R. & Zilliken, F.: Bifidus factor II. Its occurrence in milk from species and in other natural products. *Arch. Biochem. Biophys.*, **48**, 202-208 (1954).
- 9) Gedek, B.: Bakteriologische Faecesanalysen bei mit Milchaustauschern ernährten Kälbern. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A.*, **209**, 244-261 (1968).
- 10) Sahota, S. S., Bramley, P. M. & Menzies, I. S.: The fermentation of lactulose by colonic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 319-325 (1982).
- 11) Tamura, Z., Nakajima, T., Samejima, K., Yoshioka, M., Nakamura, F., Nakamura, H. & Inagaki, M.: Bifidus factor in carrot V. Isolation of new active substances. *Proc. Jpn. Acad.*, **48**, 138-148 (1972).
- 12) Kehagias, C., Jao, V. C., Mikolajcik, E. M. & Hansen, P. M. T.: Growth response of *Bifidobacterium bifidum* to a hydrolytic product isolated from bovine casein. *J. Food Sci.*, **42**, 146-150 (1977).
- 13) Yazawa, K., Imai, K. & Tamura, Z.: Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by bifidobacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3306-3311 (1978).
- 14) Conn, H. O. & Floch, M. H.: Effects of lactulose and *Lactobacillus acidophilus* on the fecal flora. *Am. J. Clin. Nutr.*, **23**, 1588-1594 (1970).
- 15) Hewitt, J. H. & Rigby, J.: Effects of various milk feeds on numbers of *Escherichia coli* and *Bifidobacterium* in the stools of newborn infants. *J. Hyg.*, **77**, 129-139 (1976).
- 16) 田中隆一郎: *Bifidobacterium* に関する研究 I. *Bifidobacterium* の選択培地 (5号投稿中)
- 17) 黒田彰夫・上山貞夫・松本圭介・田中隆一郎・高橋徳太郎・寺島経男・務台方彦: ビフィドバクテリウム菌増殖因子を含有する飲食物の製造法, 公開特許公報 (A), 昭60-41449 (1985).
- 18) 東 量三: 嫌気性菌と嫌気性菌症 (小酒井・鈴木編), 第1版, 335-338頁, 医学書院, 東京, 1968.
- 19) van der Wiel-korstanje, J. A. A. & Winkler, K. G.: The fecal flora in ulcerative colitis. *J. Med. Microbiol.*, **8**, 491-501 (1975).
- 20) Tohyama, K., Tanaka, R., Kobayashi, Y. & Mutai, M.: Relationship between the metabolic regulation of intestinal microflora by feeding *Bifidobacterium* and host hepatic function. *Bifidobacteria Microflora*, **1**, 45-50 (1982).
- 21) Cummings, J. H.: Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet*, **i**, 1206-1209 (1983).
- 22) Nose, O., Iida, Y., Kai, H., Harada, T., Ogawa, M. & Yabuuchi, H.: Breath hydrogen test for detecting lactose malabsorption in infants and children. *Arch. Dis. Child.*, **54**, 436-440 (1979).
- 23) 野瀬 幸・松本圭介・黒田彰夫: 呼気水素ガス (H_2) 分析法による TOS 負荷試験. 基礎と臨床, **15**, 418-422 (1981).
- 24) Brown, C. L., Hill, M. J. & Richards, P.:

Bacterial ureases in uremic men. *Lancet*, ii, 406-407 (1971)

25) Vince, A. & Burridge, S. M.: Ammonia production by intestinal bacteria: the effects of lactose, lactulose and glucose. *J. Med. Microbiol.*, 13, 177-191 (1980)

26) Holdeman, L. V. & Moore, W. E. C. (ed.): *Anaerobe laboratory manual*, 2nd ed., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1975.

27) Hill, M. J.: Diet and the human intestinal

bacterial flora. *Cancer Res.*, 41, 3778-3780 (1981).

28) Vince, A., Zeegen, R., Drinkwater, J. E., O'Grady, F. & Dawson, A. M.: The effects of lactulose on the fecal flora of patients with hepatic encephalopathy. *J. Med. Microbiol.*, 7, 163-168 (1974).

29) Wessliius-de Casparis, A., Brafaart, S., Berg-Bohlken, G. E. & Mimica, M.: Treatment of chronic constipation with lactulose syrup: results of a double-blind study. *Gut*, 9, 84-86 (1968).

Studies on *Bifidobacterium* II. Effects of Administration of *Bifidobacterium* and a New Growth Factor for *Bifidobacterium* on the Human Fecal Flora Ryuichiro Tanaka, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - Juzen Med. Soc., 94, 942-950 (1985)

Key Words: Bifidus-growth factor, transgalactosylated oligosaccharide (TOS), *B. Breve* 4006, Fecal flora, ammonia and indican excretion

Abstract

Fermentation abilities of 65 bacterial strains of 49 species against a new growth factor, transgalactosylated oligosaccharide (TOS), were first tested *in vitro*, and then the effects of administration of *Bifidobacterium breve* 4006 and TOS on human fecal flora were studied in 16 healthy subjects. All of the 8 species of *Bifidobacterium* actively fermented TOS, while in other 41 species 19 species fermented TOS; 19 species consisted of *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Enterobacteriaceae* species. The TOS, when administered 3 g or 10 g daily for 1 week, promoted the growth of administered *B. breve* 4006 and resident *Bifidobacterium* strains. Simultaneous administration of *B. breve* 4006 and TOS caused the suppression of *Bacteroidaceae* and *Enterobacteriaceae* population, and the reduction of fecal ammonia and urinary indican excretion. It is concluded that TOS is a new growth factor for *Bifidobacterium in vivo* as well as *in vitro*.