

## ノトバイオートマウスモデルにおける新生児の腸内フローラ形成に ガラクトオリゴ糖が及ぼす影響

鈴木百々代<sup>1,2\*</sup>, 佐藤 成<sup>1,3</sup>, 大和田 勉<sup>4</sup>  
尾崎 明<sup>4</sup>, 水谷 武夫<sup>4</sup>, 森下 芳行<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 女子栄養大学, <sup>2\*</sup> 現 (株)エイ・エル・エイ, <sup>3</sup> 現 (財)日本食品分析センター  
<sup>4</sup> 理化学研究所動物試験室, <sup>5</sup> 国立感染症研究所

### The Effect of Dietary Galactooligosaccharide on the Formation of the Infant Intestinal Microflora in Gnotobiotic Mouse Models

Momoyo SUZUKI,<sup>1,2\*</sup> Sei SATO,<sup>1,3</sup> Tsutomu OOWADA,<sup>4</sup>  
Akira OZAKI,<sup>4</sup> Takeo MIZUTANI<sup>4</sup> and Yoshiyuki MORISHITA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Kagawa Nutrition University

<sup>2\*</sup> present: ALA Co., Ltd.

<sup>3</sup> present: Japan Food Research Laboratories

<sup>4</sup> Laboratory Animal Research Center, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

<sup>5</sup> National Institute of Infectious Diseases

**要 旨** 新生児における腸内フローラの形成と推移に、ガラクトオリゴ糖 (GOS; 70% ガラクトシルラクトース (GL), 25% ラクトース, 5% グルコース) がどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、無菌マウスを用いて新生児に代表的な腸内細菌 9 菌種 *Staphylococcus epidermidis* 2414, *Escherichia coli* 128, *Enterococcus faecalis* 132, *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741<sup>T</sup>, *Clostridium perfringens* ATCC 13124<sup>T</sup>, *Bifidobacterium breve* YMM-1, *Bacteroides vulgatus* YM18, および *Eubacterium aerofaciens* 151 と *Clostridium paraputrificum* VPI 6372 を記載順に 1 週間隔で経口投与して、糞便内フローラの形成および酵素活性の追跡検討を行った。マウスには 0% または 5% GOS 添加 AIN 93G 飼料を与えた。その結果、*S. epidermidis* は GOS 摂取に関係なく、*E. coli*, *En. faecalis* の定着によって菌数が低下した。GOS 群では *En. faecalis* の菌数が、*Eub. aerofaciens*, *C. paraputrificum* の定着により有意に低下した。*L. salivarius* は GOS 群でのみ定着した。*C. perfringens* は GOS 摂取において、*B. vulgatus*, *Eub. aerofaciens* および *C. paraputrificum* の定着後、顕著に減少した。GOS 群の *Bif. breve* の菌数は実験期間を通して対照群と比べ約 100 倍も高かった。また、実験終了時の各菌種の占有率では、GOS 群で *Bif. breve*, *E. coli*, *L. salivarius* の占有率が高まった。その他の菌種は低下した。

*in vitro* における糖資化性試験では *Bif. breve* が GL の資化性が最も強く、*En. faecalis*, *B. vulgatus*, *C. paraputrificum* も資化性を示したが、その他の菌種は GL を資化しなかった。GOS 摂取により糞便、盲腸内容 pH の低下傾向が認められた。糞便中酵素活性測定試験では、GOS 摂取群での *E. coli*, *B. vulgatus* の定着後に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼにおいて、酵素活性上昇が認められた。GOS は新生児の腸内フローラの形成と菌種間の相互関係に強い影響を及ぼすことが示唆された。

**Abstract** Germfree mice were orally inoculated with representative bacterial species of infant feces singly or in combination at intervals of a week to demonstrate the effect of 5% dietary galactooligosaccharide (GOS) (70% galactosyllactose, 25% lactose, 5% glucose) on the formation of fecal microflora. We determined bacterial numbers, pH, and enzyme activities of fresh feces or cecal contents from animals and *in vitro* utilization of GOS by each bacterial species. *Staphylococcus epidermidis* was decreased by colonization by *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* irrespective of GOS. Bacterial number of *E. coli* was slightly

1998年3月10日受付

\* 〒151-0053 東京都渋谷区代々木3-28-6 Yoyogi, Shibuya-ku, Tokyo 151-0053, Japan

larger in the GOS group than in the control group. *E. faecalis* decreased after the establishment of *Eubacterium aerofaciens* and *Clostridium paraputrificum* in the GOS group. *Clostridium perfringens* remarkably decreased after the establishment of *Bacteroides vulgatus*, *Eub. aerofaciens* and *C. paraputrificum* in the GOS group but not in the control. *Bifidobacterium breve* increased about 100-fold in number in the GOS group as compared with the control. The cecal and fecal pH values were lowered in the GOS group of animals compared with those in the control when they were colonized by plural species. *Bif. breve* showed the most utilization *in vitro* of galactosylactose, and *B. vulgatus*, *Eub. aerofaciens*, *C. paraputrificum*, and *En. faecalis* moderately utilized *in vitro* the oligosaccharide. Fecal  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase, and  $\beta$ -glucuronidase activities were enhanced after the establishment of bacterial species such as *E. coli* and *B. vulgatus* mainly in the animals fed GOS. In conclusion GOS was suggested to have effects on the development of the intestinal microflora and the bacterial interaction in newborn infants.

**Key words** : galactooligosaccharide ; fecal microflora ; gnotobiotic mice

腸内細菌の多くは腸内で何らかの自らの生命活動を営み、相互に影響し合いながら腸内環境の質的量的変化、つまり宿主自身の生理的变化や食物成分の変化の影響に応じて全体として変動している(4, 6)。これらの細菌は胎児が母体から独立個体として出生して初めて定着し、腸内フローラが形成される。新生児では一般にいち早く好気性の *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* (*Streptococcus*), *Staphylococcus* が定着し、そして微好気性の *Lactobacillus* および嫌気性細菌が定着してくる。その後嫌気性細菌のうち *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* が比較的早い時期に定着する。そして6~9月齢ごろには *Eubacterium* および嫌気性グラム陽性球菌などが安定した定着状態を示すとされている(6)。この形成は当然摂取食物の影響から逃れることはできない。オリゴ糖は有用菌とされている *Bifidobacterium* 増殖促進因子であり、実用化されている(5, 6)。そこで、オリゴ糖としてガラクトシルラクトース (GL) を摂取することにより、新生児、とくに母乳摂取がむずかしい新生児を想定して、その腸内フローラ形成ならびにこれに伴う腸内酵素活性および pH に及ぼす影響を明らかにする目的で、新生児から高率に分離される菌種(1, 6)を好気性菌群をはじめに、嫌気性菌群を順次投与したノトバイオームマウスモデルを使用して実験を行った。

### 材料と方法

**1. 使用動物** : 動物は理化学研究所の動物試験室で繁殖維持されている無菌 BALB/c 系雌マウスを1群8匹ずつ、ビニールアイソレーター内で室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、明暗サイクル12時間で飼育し、飼料、飲料水は自由摂取とした。

**2. 飼料** : 基本飼料には、精製飼料 AIN-93G を用い、0% または 5% ガラクトオリゴ糖 (GOS ; GL 70%, ラクトース 25%, グルコース 5%) を添加して試験飼料とした。GOS 添加では、その分の上白糖の量を減らした。飼料は放射線滅菌 (50 kGray) した。

**3. 使用菌株** : 使用菌株は、1) *Staphylococcus epidermidis* 2414, 2) *Escherichia coli* 128, 3) *Enterococcus faecalis* 132, 8) *Eubacterium aerofaciens* 151 (以上4株; 理化学研究所動物細胞システム部より分与), 6) *Bifidobacterium breve* YMM-1, 7) *Bacteroides vulgatus* YM 18 (以上2株; 国立感染症研究所食品衛生微生物部より分与), 4) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* ATCC 11741<sup>T</sup>, 5) *Clostridium perfringens* ATCC 13124<sup>T</sup>, 8) *Clostridium paraputrificum* VPI 6372 であった。これらの菌株を毎週、上記の番号順で単独あるいは2菌種同時に経口投与した。菌株はそれぞれ ABCM 培地 (栄研化学) で培養し、約  $1 \times 10^8$  個を投与した。なお、抑制を受けることが予想される *S. epidermidis* と *C. perfringens* は、それぞれ好気性菌種、嫌気性菌種の最初に投与した。

**4. 腸内フローラの検索** : 各群4例から採取した糞便試料をそれぞれ嫌気性希釈液を用いてホモジナイズし、段階希釈して各培地に塗抹培養した。使用培地は Table 1 に示した。Trypticase soy 血液寒天 (BBL), *Staphylococcus* 培地 110 (栄研化学), DHL 寒天 (栄研化学), NA 寒天, LBS 寒天 (BBL), BL 寒天 (栄研化学), NN 寒天, BS 寒天, NBGT 寒天, ES 寒天, PO 寒天を用いた(4)。NA 寒天培地は Trypticase soy 血液寒天にナリジキス酸  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  を添加して作製した。嫌気性培養は  $\text{CO}_2$  ガス置換した Steel wool 法を用いた。培養後、グラム染色標本作製し、コロニー形態、菌形態を観察し、菌数計算を行った。

**5. 酵素活性および pH** : 上記の試料とは別に、各群から無作為にマウス5~6匹の新鮮便をチューブにプールし、直ちに  $-80^\circ\text{C}$  で凍結し、測定時に解凍し、生理食塩水で5倍希釈後 pH メーター (東亜電波工業) で pH を測定し、さらに1000倍希釈にして酵素活性測定試料とした。酵素活性は API ザイム (日本ビオメリューバイオテック) を用いて測定した。実験終了時には盲腸内容も採取し、2倍希釈してその pH を測定した。

Table 1. Culture media.

Bacteria	Media	Air condition	Incubation time(days)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2414	Stap.110, TS	aerobic	2
<i>Escherichia coli</i> 128	DHL, TS	aerobic	1
<i>Enterococcus faecalis</i> 132	NA*, TS	aerobic	1
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> ATCC 11741 <sup>T</sup>	LBS, BL	anaerobic	4
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 <sup>T</sup>	NN, BL	anaerobic	4
<i>Bifidobacterium breve</i> YMM-1	BS, BL	anaerobic	4
<i>Bacteroides vulgatus</i> YM18	NBGT, BL	anaerobic	4
<i>Eubacterium aerofaciens</i> 151	ES, BL	anaerobic	4
<i>Clostridium paraputrificum</i> VPI 6372	PO, BL	anaerobic	4

TS: trypticase soy blood, BL: glucose-blood liver, Stap.110: *Staphylococcus* 110.

DHL: deoxycholate hydrogen sulfide lactose, NA: nalidixic acid, LBS: *Lactobacillus*

selective, NN: neomycin-Nagler, BS: *Bifidobacterium* selective, NBGT: neomycin-brilliant green -taurocholate-blood, ES: *Eubacterium* selective, PO: propionete oleandomycin.

\*TS agar supplemented with nalidixic acid 100  $\mu$ g/ml.

6. *in vitro* における腸内細菌による糖資化性試験：各菌株は ABCM ブイヨン培地（栄研化学）で 37°C, 24 時間培養し、遠沈（3500 rpm, 20 min）後、沈殿に滅菌生理食塩水 1.5 ml を加え浮遊させ、接種用菌液とした。試験糖はグルコース（Merck）0.025%、ラクトース（Merck）0.125%、GOS 0.5% を用い、ABCM 糖分解用培地（栄研化学）に添加した。この培地中の寒天は濾過除去して使用した。各試験糖の添加された培地に菌液を 0.05 ml ずつ接種し、窒素ガスで置換し、ゴム栓をして 37°C, 48 時間培養後 pH を測定して各試験糖に対する各菌株の資化性を調べた。

### 成績と考察

#### 1. 各菌種の腸内における定着と推移

GOS 摂取マウスの糞便細菌叢の変化を Table 2 に示した。また実験終了時の両群間の細菌叢の比較を Fig. 1 に示した。

*S. epidermidis* の菌数は単独定着の時点では対照群、GOS 群ともに 9.0（対数値 /g）以上の高値を示したが、GOS 群の方で低値であった。しかし、本菌は *E. coli* と *En. faecalis* 定着後に両群ともにその菌数の低下が認められ、*E. coli* や *En. faecalis* によって抑制されたと考えられる。また *S. epidermidis* は 4 週目以降 GOS 群の方が菌数が高い傾向であった。これが何によるのか結論はできないが、GOS 中の 25% のラクトースを利用したためか、他の菌種の影響があったのかもしれない。この成績は森下ら（9）の通常ラットにおける GL 添加により *Staphylococcus* が減少した成績と異なるものであった。

*E. coli* は実験期間中 GOS 群で有意に高い菌数であった。これは、GOS 群では対照群に比べ軟便の傾向が見られることから、糞便の水分含量の増加と関係するののか、

あるいは GOS 中のラクトースが *E. coli* の発育に有効に作用したことも考えられる（6）。三橋ら（3）の乳児の成績では GOS 群の *E. coli* の菌数は母乳栄養児と同程度であり、人工乳栄養児よりも低く、本成績と異なる傾向である。これは食事内容、定着の速度や動物種の違いが関係するのかもしれない。

*En. faecalis* は GOS 群では *Eub. aerofaciens* と *C. paraputrificum* の定着後、菌数の低下が見られ、実験終了時には GOS 群で対照群の 1/10 ほどの有意な ( $p < 0.01$ ) 減少が認められた。資化性試験では *En. faecalis* は GOS をよく利用するので (Table 3) この減少は、*Eub. aerofaciens* と *C. paraputrificum* の GOS による活性化に伴う影響が考えられる。

*L. salivarius* は対照群では全く検出されなかったのに対して GOS 群で定着した。これは *L. salivarius* が、GOS をよく利用するために発育したものと思われた。しかしこの糖資化性試験によると、*L. salivarius* は GL 自体の資化性がないので、GOS 中のラクトースの利用に基づくものと考えられる。他の報告でも GL の投与により *Lactobacillus* の顕著な増加が認められている（2, 8）。したがって、人工乳栄養児の腸内フローラ形成時に GOS の摂取は *Lactobacillus* の定着をしやすくすることが考えられる。

*C. perfringens* は投与 1 週間後には対照群 8.7, GOS 群 8.8 と菌数はほぼ同じであり、また *Bif. breve* の定着後も、全く変化しなかったが、*B. vulgatus* の定着後 6.9 に菌数の有意な低下を示し ( $p < 0.05$ )、*Eub. aerofaciens* と *C. paraputrificum* が定着した後さらに減少した。このことは *Bif. breve* の GOS 摂取による増加および活性化が直接的に *C. perfringens* の減少をもたらさないことを示している。*C. perfringens* は GOS 摂取によって増加

Table 2. Changes of fecal bacterial counts and pH in gnotobiotic mice fed GOS diet.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10(weeks)
Bacterial counts (log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>										
Control	<i>S. epidermidis</i> 2414	9.5±0.14	6.8±0.28	4.9±0.21	4.6±0.30	5.0±0.94	4.9±0.30	4.3±0.34	3.9±0.37	3.8±0.84
	<i>E. coli</i> 128		10.0±0.10	9.8±0.05	9.8±0.29	9.7±0.19	9.7±0.15	9.9±0.19	9.4±0.15	9.4±0.15
	<i>En. faecalis</i> 132			10.0±0.10	10.1±0.17	10.1±0.13	10.2±0.00	10.3±0.15	9.9±0.26	9.9±0.13
	<i>L. salivarius</i> ATCC11741 <sup>7</sup>				0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
	<i>C. perfringens</i> ATCC13124 <sup>7</sup>					8.7±0.29	9.0±0.29	8.3±0.76	8.9±0.20	9.0±0.24
	<i>Bif. breve</i> YMM-1						8.0±0.52	8.2±0.42	8.4±0.83	8.2±0.61
	<i>B. vulgatus</i> YM18							10.7±0.10	10.6±0.06	10.6±0.16
	<i>Eub. aerofaciens</i> 151								9.4±0.32	9.5±0.42
	<i>C. paratrificum</i> VPI6372								8.6±0.39	9.3±0.71
	Total counts	9.5±0.14	10.0±0.10	10.3±0.06	10.3±0.15	10.2±0.05	10.4±0.06	10.9±0.10	10.7±0.10	10.8±0.08
Fecal pH <sup>2)</sup>	7.02	7.09	7.27	7.16	7.00	7.01	7.00	7.17	7.02	6.87
Caecal pH <sup>3)</sup>										7.46±0.11
Bacterial counts (log <sub>10</sub> CFU/g)										
GOS	<i>S. epidermidis</i> 2414	9.1±0.13***	6.7±0.27	5.0±0.97	5.2±0.80	5.4±0.33	6.3±0.67***	4.7±0.13	4.8±0.13***	4.4±0.26
	<i>E. coli</i> 128		10.4±0.05***	10.5±0.13***	10.6±0.06*	10.5±0.08***	10.5±0.14***	10.5±0.13***	10.3±0.05***	10.3±0.06***
	<i>En. faecalis</i> 132			9.6±0.05***	9.9±0.13	10.1±0.14	10.0±0.15*	10.1±0.17	9.2±0.25	9.0±0.13***
	<i>L. salivarius</i> ATCC11741				6.7±1.80***	5.6±1.53***	7.0±0.20***	7.4±0.22***	7.4±0.14***	7.8±0.53***
	<i>C. perfringens</i> ATCC13124					8.8±0.41	8.8±0.33	6.9±0.42*	2.0±0.00***	3.9±2.55*
	<i>Bif. breve</i> YMM-1						10.2±0.17***	10.2±0.24***	10.2±0.08***	10.4±0.14***
	<i>B. vulgatus</i> YM18							10.8±0.13	10.6±0.05	10.6±0.15
	<i>Eub. aerofaciens</i> 151								9.5±0.52	9.7±0.85
	<i>C. paratrificum</i> VPI6372								9.5±0.22***	9.0±0.28
	Total counts	9.1±0.13***	10.4±0.05***	10.6±0.10***	10.6±0.00***	10.7±0.13***	10.8±0.13***	11.1±0.13*	11.0±0.05***	11.0±0.10*
Fecal pH	7.11	7.18	6.90	6.98	6.83	7.06	6.90	6.88	6.97	6.91
Caecal pH										7.14±0.29*

Significantly different from control group (\*p<0.05, \*\*\*p<0.01); <sup>1)</sup>n=4, <sup>2)</sup>n=1, <sup>3)</sup>n=8  
CFU; colony-forming units

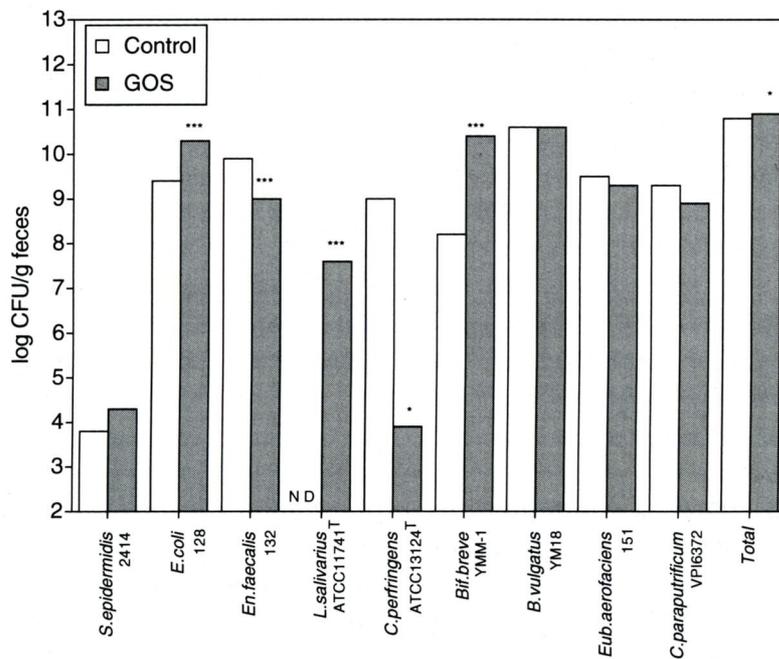


Fig. 1. Effects of GOS on fecal microflora in gnotobiotic mice two weeks after the last inoculation.

\*Significantly different from GOS for control group (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$ ), ND : not detected.

Table 3. *In vitro* utilization of sugars by bacterial strains.

	Control <sup>(A)</sup>	Glucose <sup>(B)</sup>		Lactose <sup>(C)</sup>		GOS <sup>(D)</sup>		GL*
	0%	0.025%		0.125%		0.5%		
<i>S. epidermidis</i> 2414	6.97	6.79	-	6.69	(+)	6.52	(+)	-
<i>E. coli</i> 128	6.04	5.94	-	5.50	+	5.26	+	-
<i>En. faecalis</i> 132	6.91	6.75	-	5.82	++	5.11	++	+
<i>L. salivarius</i> ATCC11741 <sup>T</sup>	6.31	6.06	(+)	5.06	++	4.94	++	-
<i>C. perfringens</i> ATCC13124 <sup>T</sup>	6.51	6.31	(+)	6.22	(+)	6.05	(+)	-
<i>Bif. breve</i> YMM-1	6.27	6.25	-	5.47	+	4.44	++	++
<i>B. vulgatus</i> YM18	6.45	6.25	(+)	5.88	+	4.92	++	+
<i>Eub. aerofaciens</i> 151	6.67	6.34	(+)	6.20	(+)	5.77	+	-
<i>C. paraputrificum</i> VPI6372	6.39	6.25	-	5.81	+	5.13	++	+

Decrease of pH (x); ++:  $x \geq 1.0$ , +:  $0.5 \leq x < 1.0$ , (+):  $0.2 \leq x < 0.5$ , -:  $x < 0.2$

\*(A - D) - {(A - B) + (A - C)}; Utilization of GL was excepted influence of glucose and lactose in GOS.

した *Bifidobacterium* の影響で減少するという報告が多数ある (6, 10). しかし今回の成績は, *B. vulgatus*, *Eub. aerofaciens* および *C. paraputrificum* が *C. perfringens* の菌数の低下に強く関与していることを示している. しかし, この効果はすでに定着している菌種の影響が基礎的にある上に生じたことも考えられ, 今後の菌種の定着順も含めさらに検討を要する. また本実験では *C. perfringens* は糖資化性試験において GOS を資化しな

かった. 大塚らの結果では, *C. perfringens* は資化しないが (11), 石川らによると *C. perfringens* は GOS を資化する (2). これらの資化性試験の結果の違いは, 純度, 測定方法および使用菌株の違いによる可能性が考えられる.

*Bif. breve* は定着以降 GOS 群の方が 10.2 と対照群の 8.0 に比べ菌数が 100 倍ほど高かった ( $p < 0.01$ ). これは糖資化性試験によってもわかるように, *Bif. breve* は他

の細菌よりも GL を非常によく利用しており、そのために対照群との有意な差が認められたものと思われる。石川らは試験した 4'-GOS 3 糖 (3 糖純度 99%, 主成分 4'-ガラクトシルラクトース) を、ヒト由来の *Bifidobacterium* 5 菌種 (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*) すべてが資化することを報告している (2)。また三橋らの実験でも *Bif. breve* は GOS をよく利用していた (3)。また大塚らによると、4'GL は上記 4'-GOS 3 糖と同一物質であるが、*Bifidobacterium* spp. は資化する (11)。一般にオリゴ糖摂取は、ヒト、実験動物において *Bifidobacterium* の著しい増加が認められているが、今回の成績はそれをマウスモデルにおいて、明瞭に証明したことになる。

*B. vulgatus* は GOS 群、対照群ともに 10.7 前後というほぼ同じ菌数を維持し、最優勢菌であった。*B. vulgatus* が他の菌種の影響を受けているとは考えられない。

最後に投与した *Eub. aerofaciens* と *C. paraputrificum* のうち *Eub. aerofaciens* は両群とも 9.5 前後で変化はなく、*C. paraputrificum* は対照群では 8.6~9.3, GOS 群では 9.0~9.5 であった。*C. paraputrificum* は菌数面での影響は少ないようであるが、これは *in vivo* では他の GOS 資化菌種が影響しているのかもしれない。しかし本菌種は資化菌種であるので (Table 3), その活性に影響を及ぼしたことも考えられる。

総菌数では対照群の 10.8 に比べ GOS 群の方が 11.0 と菌数が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。また実験終了時の

マウス糞便中における総菌数に占める各菌株の割合を、Fig. 2 に示した。対照群は *B. vulgatus* が 64.8% を占め、つぎに *En. faecalis* 13.9%, *C. paraputrificum* 8.4%, *Eub. aerofaciens* 6.7%, *E. coli* が 4.4%, *C. perfringens* 1.6%, *Bif. breve* 0.4%, *S. epidermidis* 0.01% 以下、*L. salivarius* 0% となった。一方 GOS 群では対照群と同様に *B. vulgatus* が最優勢であったが (47.2%), *Bif. breve* の占有率は 27.3% と著しく増大し、以下 *E. coli* 18.2%, *Eub. aerofaciens* 5.2%, *C. paraputrificum* 1.1%, *En. faecalis* 1.0% であった。対照群では全く検出されなかった *L. salivarius* は、GOS 群では 0.1% であった。また *C. perfringens*, *S. epidermidis* は 0.01% 以下であった。このように占有率の点でも GOS が *Bif. breve* の増殖を著しく促進することが明らかになった。ヒトおよび実験動物でも *Bifidobacterium* の占有率が大きくなり (2), 反対に *Bacteroides*, *Clostridium*, *E. coli* および *Peptostreptococcus* は減少する場合が多いことが報告されている (2, 6, 9)。

## 2. 使用菌株による糖資化性試験

今回実験に使用した GOS には GL 70%, ラクトース 25%, グルコース 5% が含まれているため、それぞれの濃度について試験した。また実験結果より計算上の GL 100% の資化性を評価した。資化性の程度は糖添加 0% を対照として、pH が 1.0 以上低下したものを [++], 0.5 以上 1.0 未満低下したものを [+], 0.2 以上 0.5 未満低下したものを [(+)], pH の低下が 0.2 未満のものを

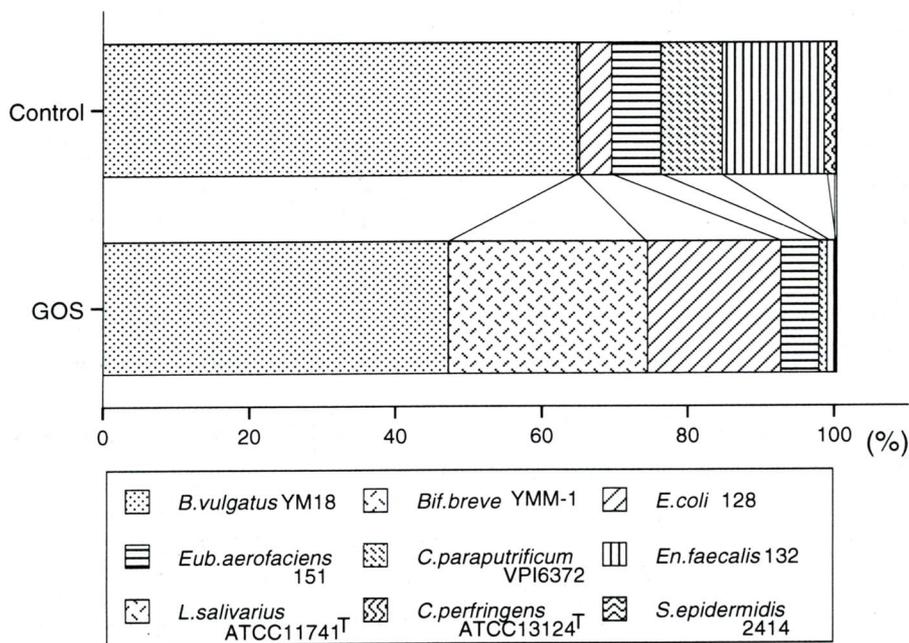


Fig. 2. Composition of fecal microflora two weeks after the last inoculation.

[-] とした (Table 3).

計算上の GL は, *Bif. breve* が最もよく利用した. *En. faecalis*, *B. vulgatus*, *C. paraputrificum* は中程度に利用し, *S. epidermidis*, *E. coli*, *L. salivarius*, *C. perfringens*, *Eub. aerofaciens* は GL をほとんど利用しなかった.

### 3. 糞便 pH および盲腸内容の pH

糞便および盲腸内容の pH を Table 2 に示した. 糞便 pH は全期間を通じた平均が GOS 群 6.97, 対照群 7.06 と前者が有意に低かった ( $p < 0.05$ ). また, 盲腸内容の pH も GOS 群 7.14, 対照群 7.46 と GOS 群が有意に低かった ( $p < 0.05$ ). 糞便および盲腸内容の pH は, GOS 群で有意に低かった. これは, GOS の腸内発酵の影響に

基づくものと考えられる (7).

### 4. 酵素活性

糞便中の酵素活性への影響を Fig. 3 に示した. GOS 群では *E. coli* 定着後  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (ラクターゼ) 活性が高くなった (Fig. 3 A). これは *E. coli* の GOS による  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性上昇を示唆している. しかし  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は *En. faecalis* の投与後から低下することから, *E. coli* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は他の菌種によって抑制されることが考えられる. その後 7 週目すなわち *B. vulgatus* の定着後に再び  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は上昇した. 対照群では 6 週目までは活性が全く見られず, 7 週目から活性が高くなっ

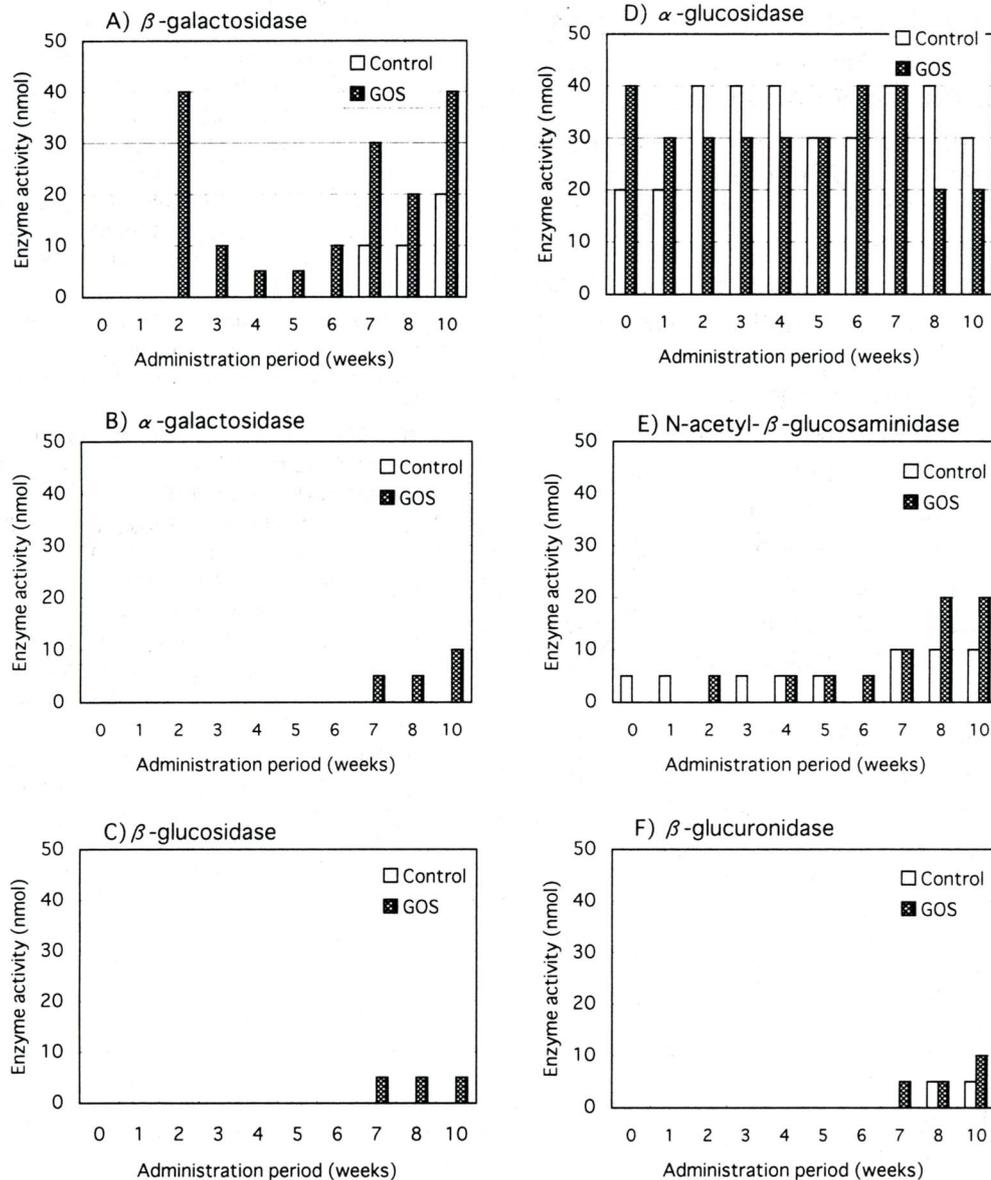


Fig. 3. Effects of GOS on bacterial glycolytic activities in the feces of gnotobiotic mice.

た。このように、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が実験期間を通して対照群に比べGOS群で高かったのは、基質となるGOSの存在によるものと考えられる。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼと $\beta$ -グルコシダーゼの活性がGOS群でのみ7週目から見られたのは、*B. vulgatus*による影響と思われる(Fig. 3B,C)。また、 $\beta$ -グルコシダーゼは*Bacteroides*のほか*En. faecalis*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*も活性を示すといわれているが(6)、本実験においてはこれらの菌種の影響は認められなかった。 $\alpha$ -グルコシダーゼは実験開始時の無菌状態から両群ともに活性が認められ、GOS群は対照群の2倍であったが2週目以降は対照群よりもGOS群において活性は低い傾向であった。(Fig. 3D)。N-アセチル- $\beta$ -グルコサミンダーゼの活性は6週目までは低く、*B. vulgatus*定着後、軽度の上昇があり、*Eub. aerofaciens*と*C. paraputrificum*の定着後GOS群でさらに活性上昇が見られた(Fig. 3E)。 $\beta$ -グルクロニダーゼは*E. coli*, *Clostridium*, *Bacteroides*の一部の菌種に活性があるといわれている(6)。しかし本実験ではGOS群において*B. vulgatus*定着以後、対照群では*Eub. aerofaciens*と*C. paraputrificum*の定着後 $\beta$ -グルクロニダーゼ活性が認められた(Fig. 3F)。この活性の出現は、菌種構成が複雑になったことに関与すると考えられる。*Bacteroides*の多くは、多糖類を分解し、少糖化するため、*Bifidobacterium*など、多糖類を分解しにくい菌種の発育を助ける働きがあることが知られている(6)。本成績は、糖類の分解酵素活性化の多くに*Bacteroides*が関与していることを示した。しかし、各菌種の活性の程度は腸管の部位によって異なることも考えられるので、糞便だけで全てを推測し結論づけることはできないであろう。なお上記以外の酵素については両群間で大きな違いは認められなかった。

以上の成績から、GOS摂取は腸内フローラ形成において糞便中の細菌数を増加させ、腸内発酵を行う*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*の定着を促し、腸内腐敗を引き起こす*C. perfringens*の減少に*B. vulgatus*, *Eub.*

*aerofaciens*および*C. paraputrificum*のGOSによる活性化が影響していると考えられた。

謝辞：オリゴ糖ならびに飼料を提供していただいた雪印乳業株式会社に深謝いたします。

#### 引用文献

- (1) Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. 1984. The intestinal microflora of infants: Composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* **28**: 975-986.
- (2) 石川文保, 高山博夫, 松本圭介, 伊藤正紀, 長南 治, 出口ヨリ子, 菊地(早川) 弘子, 綿貫雅章. 1995.  $\beta$ 1-4系ガラクトオリゴ糖のヒト腸内菌叢に及ぼす影響. *ビフィズス* **9**: 5-18.
- (3) 三橋重之, 吉浜 誠, 八尋政利, 西川 勲, 出家栄記, 阿彦健吉, 光岡知足. 1983. オリゴ糖の乳児腸内フローラと便性に及ぼす影響. 光岡知足編, 腸内フローラと栄養, p. 45-67, 学会出版センター, 東京.
- (4) 光岡知足. 1980. 腸内菌の世界—嫌気性菌の分離と同一—. p. 53-65, 叢文社, 東京.
- (5) Mitsuoka T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *J Indust Microbiol* **6**: 263-267.
- (6) 森下芳行. 1990. 腸内フローラ構造と機能. 朝倉書店, 東京.
- (7) Morishita Y, Konishi Y. 1994. Effects of high dietary cellulose on the large intestinal microflora and short-chain fatty acid in rats. *Lett Appl Microbiol* **19**: 433-435.
- (8) 森下芳行, 小西良子, 田中隆一郎, 務台方彦. 1992. ラット・マウスにおける転移オリゴ糖のフローラと盲腸内短鎖脂肪酸生成に及ぼす影響. *ビフィズス* **6**: 11-17.
- (9) 森下芳行, 大塚耕太郎, 澤入淑人, 小澤 修. 1993. 4'ガラクトシルラクトースのラットの盲腸内フローラおよび短鎖脂肪酸に及ぼす影響. *ビフィズス* **7**: 21-27.
- (10) 緒方幸代, 藤田孝輝, 石神 博, 原 耕三, 寺田 厚, 原 宏佳, 藤森 勲, 光岡知足. 1993. 4<sup>G</sup>- $\beta$ -D-Galactosylsucrose (Lactosucrose)の少量摂取がヒト腸内フローラおよび糞便性状に及ぼす影響. *日本栄養・食糧学会誌* **46**: 317-323.
- (11) 大塚耕太郎, 辨野義己, 遠藤希三子, 上田弘嗣, 小澤修, 内田隆次, 光岡知足. 1989. 4'ガラクトシルラクトースのヒトの腸内フローラに及ぼす影響. *ビフィズス* **2**: 143-149.