

Lactobacillus plantarum HOKKAIDOでつくった発酵豆乳摂取による ヒト糞便性状および有用菌数の変化

中川良二, 能登裕子, 八十川大輔

Changes in fecal properties and the number of useful intestinal bacteria in healthy human adults by intake of soymilk fermented with *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO

Ryoji Nakagawa, Hiroko Noto and Daisuke Yasokawa

Soymilk fermented with *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO was examined for its effect on fecal properties and growth of useful intestinal bacteria in sixteen healthy volunteers (ages 24-83 years). Fecal properties were not affected by the intake of the fermented soymilk. Subjects who had a low number of *Lactobacillus* (less than 1.0×10^7 CFU/g, 2 subjects) or *Bifidobacterium* (less than 5.0×10^8 CFU/g, 2 subjects) in feces showed a significant increase in viable cell numbers of these bacteria during fermented soymilk feeding. Most of the fecal *Lactobacillus* detected in randomly selected fecal specimens during feeding belonged to the HOKKAIDO strain. We conclude that the fermented soymilk functioned as a synbiotics.

ヒトの腸内には非常に多くの腸内細菌が常在し、それらが形成する腸内菌叢の構成が腸内代謝に影響を及ぼし、栄養、生理機能、老化、癌、免疫機能などヒトの健康に深く関係していることが示されている¹⁾。腸内菌叢を構成する *Lactobacillus* などの乳酸菌や *Bifidobacterium* がヒトの健康維持に重要であるとの示唆から、これらの細菌を積極的に増殖させる生菌含有製剤や *Bifidobacterium* 増殖因子であるオリゴ糖含有製剤などのプロバイオティクスやプレバイオティクス製品が注目されている。

Lactobacillus は高い消化液耐性を有し、生きて腸まで到達する菌種が多く、また、免疫作用などヒトの消化器管内で積極的な機能性をもつことが示されている²⁾³⁾。*L. plantarum* は漬物などの発酵食品で見出される有用菌種⁴⁾であり、また、ヒト腸内常在菌としても知られ、特にベジタリアンでは優勢菌であることが示されている⁵⁾。これら乳酸菌の保健機能性としては、免疫バランス改善などの効果を有することが報告されている⁶⁾。

我々は良く漬かった家庭の漬物からヒト腸上皮培養細

胞株 Caco-2 に対して付着活性を有する乳酸菌を分離し、*Lactobacillus plantarum* と同定すると共に、本菌株を *L. plantarum* HOKKAIDO (以下 HOKKAIDO と略す) と名付けた。また、当該乳酸菌を用いて豆乳を原料としたヨーグルト様の発酵豆乳を調製し、本食品が乳酸菌を高含有し、*Bifidobacterium* 増殖因子であるラフィノースおよびスタキオースなどのラフィノースシリーズオリゴ糖を豊富に含むことからシンバイオティクスである可能性を示した⁷⁾。

本研究では発酵豆乳の *in vivo* でのシンバイオティクスの検証を目的として、健康成人を被験者として発酵豆乳摂取試験を実施し、糞便性状、糞便内の *Lactobacillus* 数および *Bifidobacterium* 数、糞便内の HOKKAIDO 株の出現数について検討した。

1. 実験方法

(1) 供試試料

本試験では、HOKKAIDO 株をスタータとしてつくら

事業名：重点領域特別研究

課題名：ラクトバチルスプラントラム HOKKAIDO 株を用いた機能性豆乳ヨーグルトの製品化

れたヨーグルト様の発酵豆乳（生菓子，（株）豆太製）を使用した。発酵豆乳の基本製法は中川らの方法⁸⁾に準じているが，乳酸菌スタータは豆乳（固形分7%）を増菌培地として用い，発酵豆乳中の *Lactobacillus* は，試験開始時において 1.0×10^7 CFU/g 以上存在した。また，一般成分値は炭水化物 82.5mg/g，タンパク質 28.8mg/g，脂質 33.8mg/g，食物繊維 6mg/g であった。ラフィノースシリーズオリゴ糖は 4.5mg/g 含有した。

(2) 摂取試験

被験者は，健康成人 16名（男性 6名，女性 10名，24～83歳，平均 48歳）であった。なお，本試験の実施に当たり，ヘルシンキ宣言に従い，当センター倫理委員会での承認を受けると共に，被験者には試験内容を十分に説明し，書面による同意を得て実施した。

発酵豆乳の摂取期間によって 2グループに分け，第 1グループは 10名，7日間，第 2グループは 6名，14日間摂取することとし，表 1 に被験者の性別・年齢を記した。発酵豆乳は 80g/日を食後に摂取してもらい，期間中の発酵食品やオリゴ糖配合食品など食品の制限は行わなかった。

(3) 糞便性状の調査

調査は飯野ら⁹⁾に準拠し，排便回数，排便量，便の臭い，便の形状，便の色，スッキリ感，健康状態などの 7項目について行い，アンケート方式により集計した。各項目について被験者の目視判定を数値化し，各試験期間中の排便 1 回当たりの平均値を求めた。

(4) 糞便内の *Lactobacillus* 数および *Bifidobacterium* 数の測定

糞便の採取は，第 1グループでは試験開始前日，摂取 7日目，摂取終了後 7日目，14日目，21日目，第 2グループでは試験開始前日，摂取 7日目，14日目，摂取終了後 7日目，14日目のそれぞれ計 5 回実施した。定法に従って糞便検体の 10% 乳剤を調製し，混釈法により行った。

Lactobacillus 数は MRS 寒天培地 (Difco)，*Bifidobacterium* 数は TOS プロピオン酸寒天培地 (ヤクルト) を用い，使用手順に準じて培養後，各コロニー数を計測した。

(5) *L. plantarum* および HOKKAIDO 株の識別

各細菌用の寒天培地上に出現した最高希釈段階のシャーレから既報¹⁰⁾に従って DNA を抽出した。*L. plantarum* の検出は，これを鋳型として Torriani ら¹¹⁾の報告した *L. plantarum* を迅速かつ容易に識別する recA 遺伝子領域をマーカーとして用いる PCR 法にて行った。さらに，HOKKAIDO 株の検出は Dautle ら¹²⁾ および Spano ら¹³⁾ によって報告されたシングルプライマーを用いる RAPD 法により，その特異的バンドパターンから他株と識別した。

2. 実験結果

(1) 被験者の健康状態および糞便性状への影響

全試験期間中を通じ，被験者 16名の健康状態に特記すべき異常は認められなかった。

被験者の排便状況は，1週間当たりに換算した各試験期間の平均値がそれぞれ排便日数約 6日，排便回数約 9回，排便量は鶏卵換算で約 16個であり，第 1および第 2グループともに排便状況に大きな変化は認められなかった。糞便の状態（臭い，形状および色）については，発酵豆乳の摂取期間中，便色が褐色から黄土色化する傾向を示したが，他にほとんど変化が認められなかった。排便後のスッキリ感についても，発酵豆乳摂取による変化は確認できなかった（以上のデータは，未掲載）。

(2) 糞便内 *Lactobacillus* 数および *Bifidobacterium* 数への影響

図 1 に示されたように，糞便内 *Lactobacillus* 数は摂取前では 10^6 から 10^9 CFU/g の範囲にあり，第 1グループでは平均 3.3×10^8 CFU/g，第 2グループでは 2.0×10^8 CFU/g であった。摂取 7日目では， 10^7 から 10^9 CFU/g になり，第 1グループでは 3.5×10^8 CFU/g，第 2グループでは 2.6×10^8 CFU/g であった。第 2グループの摂取 14日目では 1.0×10^9 CFU/g に増加した。摂取前 1.0×10^7 CFU/g 以下であった被験者（2名：女，30歳；男，38歳）では，発酵豆乳摂取により 1.0×10^7 CFU/g 以上にまで増加した。

図 2 に示されたように，糞便内 *Bifidobacterium* 数は摂取前では 10^8 から 10^{10} CFU/g の範囲にあり，第 1グループでは平均 5.5×10^9 CFU/g，第 2グループでは 4.7×10^9 CFU/g であった。摂取 7日目では， 10^9 から 10^{10} CFU/g になり，第 1グループでは平均 8.1×10^9 CFU/g，第 2グループでは 5.6×10^9 CFU/g であった。第 2グループ

表 1 被験者の性別および年齢

第 1 グループ				第 2 グループ			
	性別	年齢		性別	年齢		
被験者 1	男	51	被験者 1	男	29		
被験者 2	女	32	被験者 2	男	38		
被験者 3	男	43	被験者 3	女	28		
被験者 4	女	24	被験者 4	女	44		
被験者 5	男	42	被験者 5	女	58		
被験者 6	女	30	被験者 6	女	54		
被験者 7	女	72					
被験者 8	女	83					
被験者 9	男	72					
被験者 10	女	71					

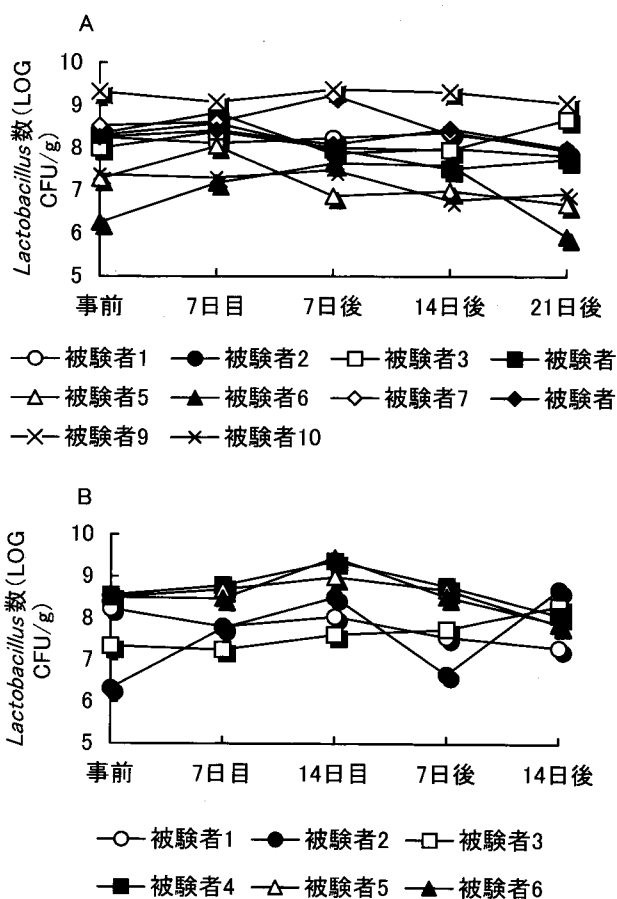


図1 発酵豆乳摂取によるLactobacillus数の変化
A: 第1グループ, B: 第2グループ

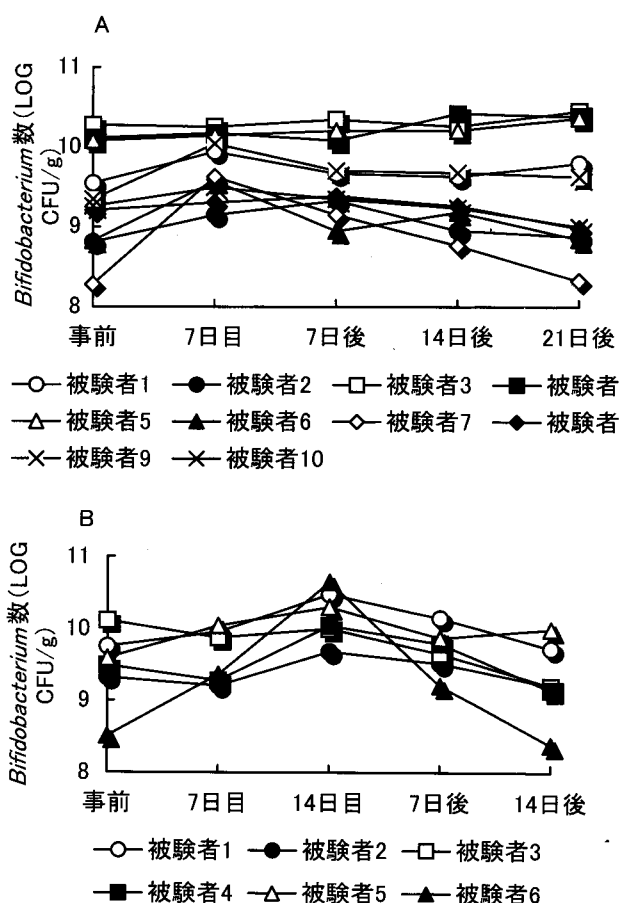


図2 発酵豆乳摂取によるBifidobacterium数の変化
A: 第1グループ, B: 第2グループ

プの摂取14日目では 1.0×10^{10} CFU/g に増加した。摂取前 5.0×10^8 CFU/g 以下であった被験者（2名:女, 72歳; 女, 54歳）の Bifidobacterium 数は、発酵豆乳の摂取により顕著に増加したが、摂取終了14日後または21日後にはほぼ摂取前の菌数になった。

(3) Lactobacillus に占める HOKKAIDO 株の割合

第1グループから無作為に選んだ被験者3名について、発酵豆乳摂取前と摂取後での Lactobacillus に占める L. plantarum の割合を調べた(表2)。摂取前では13.9% (5/36) であったが、摂取7日目では75.0% (27/36) を占めた。しかし、摂取終了7日後には19.4% (7/36)、14日目には11.1% (4/36) に減少した。この内の HOKKAIDO 株の占める割合を Multiplex PCR によって調べたところ、Lactobacillus の近縁種と推定されるコロニーの69.4% (25/36) が HOKKAIDO 株と推定されるバンドパターンを示した。しかしながら、摂取終了7日後では2.8% (1/36)、14日目では検出されなかった(表2)。

表2 糞便中のLactobacillusに占めるL. plantarum およびHOKKAIDO株の割合

	L. plantarum	HOKKAIDO株
摂取前	5/36	0/36
摂取7日目	27/36	25/36
摂取終了7日後	7/36	1/36
摂取終了14日後	4/36	0/36

3. 考察

本試験は健康な成人16名を被験者として実施した。糞便性状は、発酵豆乳摂取による明確な変化を示さなかった。健康人を対象とした場合、もともと糞便性状、腸内菌叢および腸内腐敗産物量が正常域にある場合が多く、これらの変化が起こりにくい傾向にある¹⁴⁾。

本試験においても、糞便内 Lactobacillus 数および Bifidobacterium 数は全体として変化が少なかったが、それらの菌数が特に少ない被験者(各2名)では増加傾向を示した。しかしながら、摂取を中止すると、2~3週間経過後には摂取前の菌数に戻ったことから、恒常的な菌数維持には定期的な摂取が必要であろうと思われた。

発酵豆乳摂取中の糞便内 *Lactobacillus* が主に HOKKAIDO 株であった。前報で我々は HOKKAIDO 株の人口消化液耐性試験を実施し、HOKKAIDO 株が人口腸液中で約 1000 倍に増加したことを示した⁷⁾。これらの結果から、摂取された HOKKAIDO 株が生きて腸まで到達し、さらに腸内で増殖したと推察される。糞便内の *Bifidobacterium* の増加には、少なくとも発酵豆乳中のラフィノースシリーズオリゴ糖がプレバイオティクスとして働いたことが影響している。したがって、本研究により、当該発酵豆乳がシンバイオティクスとして機能することが明らかとなった。

4. 要約

健康成人 16 名を被験者として、*L. plantarum* HOKKAIDO を用いてつくられた発酵豆乳の摂取試験を実施し、糞便性状、糞便内 *Lactobacillus* 数および *Bifidobacterium* 数について調べた。その結果、発酵豆乳の摂取により、糞便性状に特に変化は認められなかった。*Lactobacillus* 数または *Bifidobacterium* 数はそれらの菌数が特に少ない被験者で、それぞれ顕著に増加した。しかしながら、摂取終了数週間後には摂取前の菌数に戻った。また、摂取期間に検出される乳酸菌の多くは HOKKAIDO 株であった。

本研究を実施するにあたり、多大なるご協力を賜りました(株)豆太代表取締役岡内宏樹氏に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 光岡知足, 腸内フローラの機能と機能性食品, 「腸内フローラと健康」, 初版, 光岡知足編, (学会出版センター関西, 大阪), pp.143-196 (1998).
- 2) Kishi, A., Uno, K., Matsubara, Y., Okuda, C., and Kishida, T., Effect of the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* on interferon-alpha producing capacity in humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, **15**, 408-412 (1996).
- 3) Stig Bengmark, プロバイオティクス・プレバイオティクスによる免疫制御, 「腸内フローラと生活習慣病」, 初版, 光岡知足編, (学会出版センター, 東京), pp.41-60 (2001).
- 4) 小川敏男, 塩と漬物, 「漬物製造学」, 第 1 版 (光琳, 東京), pp.27-29 (1989).
- 5) Adlerberth, I., Ahrne, S., Johansson, M. L., Molin, G., Hanson L. A., and Wold, A. E., A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2244-2251 (1996).
- 6) Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H. and Yoshikai, Y., Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J. Allerg. Clin. Immunol.*, **102**, 57-64 (1998).
- 7) 中川良二, 藪内裕子, 八十川大輔, 長島浩二, *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO を用いた豆乳ヨーグルトの製造およびその機能性, *食科工*, **52**, 140-143 (2005).
- 8) 中川良二, 八十川大輔, 長島浩二, 新規な乳酸菌とそれを用いて得られる発酵豆乳およびその製造方法, 特許第 3925502 号 (2007.3.9)
- 9) 飯野久和, 松本由果, 伊藤美香, 阿部忍, 菅浦敏夫, 有孢子性乳酸菌 (*Bacillus coagulans*) による便性改善効果についての研究, *Progress in Medicine*, **17**, 3299-3302 (1997).
- 10) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸, 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフローラ解析への応用, *食科工*, **45**, 58-65 (1998).
- 11) Torriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio, F., Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3450-3454 (2001).
- 12) Dautle, M. P., Ulrich, R. L. and Hughes, T. A., Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 414-421 (2002).
- 13) Spano, G., Beneduce, L., Tarantino, D., Zapparoli, G. and Massal, S., Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, **35**, 370-374 (2002).
- 14) 東幸雄, 伊藤和徳, 大木篤史, 井上明浩, 井上和久, 佐藤学, 辨野義己, *Lactobacillus gasseri* NY0509 および *Lactobacillus casei* NY1301 発酵乳酸菌飲料の健康成人の糞便内菌叢に及ぼす影響, *食科工*, **48**, 35-43 (2001).