Lactobacillus paracasei NFRI 7415の人工消化液耐性 およびマウスの盲腸内有機酸に及ぼす影響

工藤 瞳*・網野千里*・星野也実*・島 純**・小松崎典子*

(*聖徳大学人間栄養学部, **龍谷大学農学部)

(令和2年4月21日受付, 令和2年10月21日受理)

Simulated digestive juice tolerance and effect on cecal organic acids of mice of *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415

Hitomi Kudo*, Chisato Amino*, Narumi Hoshino*,
Jun Shima**, Noriko Komatsuzaki*

*Faculty of Human Nutrition, Seitoku University,
550, Iwase, Matsudo-shi, Chiba, 271-8555

**Faculty of Agriculture, Ryukoku University,
1-5, Yokotani, Seta Oe-cho, Otsu-shi, Shiga, 520-2194

*〒271-8555 千葉県松戸市岩瀬550

**〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1-5

We examined the simulated digestive juice tolerance and effect on cecal organic acids of mice of *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415, evaluating it with *in vitro* and *in vivo* assay systems and using *Lactobacillus casei* for comparison.

In *in vitro* assays, the cholesterol adsorption rate of *L. casei* and *L. paracasei* were 39.4% and 50.9%, respectively, and bile acid adsorption rates 33.8% and 40.9%. Cholesterol adsorption was higher in *L. paracasei* than in *L. casei*, and it was revealed that the survival rate of *L. paracasei* in the stomach was high. In addition, *L. paracasei* showed gastric juice resistance and bile tolerance. As a result of testing for harmful intestinal bacteria of *L. paracasei* and *L. casei*, the growth of *Escherichia coli* was inhibited in the mixed-cultured with *L. casei*. But, *L. paracasei* was not observed the effect of inhibiting the growth of the harmful intestinal bacteria.

In order to investigate organic acid in appendix contents, male ICR mice were divided into two feeding groups for 4 weeks: a control (CO) group and a lactic acid bacterium (LB) group. Among organic acids in appendix contents, acetic acid showed the highest value in both groups. In the LB group, lactic acid and iso-butyric acid were also detected, but they were not detected in the CO group. These organic acids are a metabolism product produced in intestinal bacteria, and therefore indicate that *L. paracasei* had an influence on the intestinal microflora of the LB group.

1. 緒 言

ヒトの腸管内には、1,000種類以上、100兆個、重量で約1 kgの腸内細菌が存在している¹⁾。腸内環境は健康

に深く関連しており、腸内細菌叢のバランスを整えることが疾病の予防や改善に有効であると考えられている²⁾。乳酸菌は、古来よりヨーグルトやチーズなどの乳製品をはじめ、清酒、ワイン、漬物と幅広い発酵食品に利用さ

れており、整腸作用や免疫活性の維持・向上の作用などがあることが知られている^{3,4)}。乳酸菌を摂取することにより、プロバイオティクス効果が期待される。

Lactobacillus paracasei NFRI 7415 (以後 *L.paracasei*) は、ふなずしから分離された乳酸菌である⁵⁾。これまでの研究で、*L.paracasei* を摂取したマウスの糞中コレステロール量が摂取していないマウスに比べて有意に増加したことから、菌体が腸管内のコレステロールを吸着して体外に排泄する能力を有することが明らかとなった⁶⁾。乳酸菌のコレステロール低下作用の機序にはコレステロール吸着のほかに、菌体の胆汁酸吸着作用がある⁷⁾。菌体のコレステロール吸着作用は、小腸からのコレステロール吸収を抑制し、胆汁酸吸着作用は、胆汁酸の腸管循環を抑制することで体内コレステロールを減少させると考えられている。また、乳酸菌がプロバイオティクスとして効果を発揮するためには、胃酸や胆汁に対する耐性能力をもち、生きて腸に到達することが必要である⁸⁾。

腸管内で腸内細菌が生成する代謝産物に、酢酸やプロピオン酸などがある。これらの有機酸は、大腸上皮細胞のエネルギー源となり、小腸や大腸の上皮細胞の増殖速度を上げて、上皮細胞数の維持に貢献している^{9,10)}。食事で摂取したオリゴ糖や食物繊維などは大腸で腸内細菌が産生する酵素により分解され、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの有機酸に変換される¹¹⁾。本乳酸菌の摂取は腸内の乳酸菌を増殖させ、その代謝産物である有機酸の生成にも変化をもたらす可能性があると考えられる。

本研究では、*L.paracasei* のプロバイオティクス効果について検討することを目的として、*in vitro* による菌体のコレステロール吸着および胆汁酸吸着試験、人工胃液耐性、胆汁耐性試験、大腸菌 (*Escherichia coli*) などの腸内細菌の生育に対する抑制試験を行った。さらに、マウスを用いて本菌株が盲腸内容物中の有機酸生成に及ぼす影響についても検討した。

2. 方 法

(1) コレステロールおよび胆汁酸吸着試験

1) 供試菌株および培養

Lactobacillus paracasei (NFRI 7415) およびその比較対照菌株として *Lactobacillus casei* (NBRC 15883) を、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NBRC) より購入した。*L.paracasei* および *L.casei* をそれぞれ MRS (Difco laboratory, Detroit, MI) 培地で37℃、18時間静置培養した。静置培養した培養液1 mLを新たな MRS 液体培地1 Lに接種し、37℃で48時間静置培養した。培養後、それぞれの培養液を遠心分離 (1,500×g, 10分, 4℃) して菌体を回収し、滅菌水で3回洗浄した後、凍結乾燥処理を行った。凍結乾燥物は、デシケータに入れ常温保存した。

2) コレステロール吸着試験

粉末乳酸菌 (凍結乾燥物) 12 mg をコレステロール溶液 (1 mg/mL) 1.5 mL に懸濁し、37℃で1時間保温した。

2,000 × g, 5 分間遠心分離を行い、上清中のコレステロール濃度をコレステロール E-テストワコー (和光純薬株式会社製) を用いて測定した。

3) 胆汁酸吸着試験

粉末乳酸菌 (凍結乾燥物) 12 mg を1.25 mmol/L コール酸ナトリウム溶液 (10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8)) 1.5 mL に懸濁し、37℃で2時間保温した。それらを5,000 × g, 2 分間遠心分離した。上清中の胆汁酸濃度は、総胆汁酸テストワコー (和光純薬株式会社製) を用いて測定した。胆汁酸吸着能は、胆汁酸吸着率% (吸着した胆汁酸量 / 元の胆汁酸量 × 100) で示した¹²⁾。

(2) 人工消化液耐性試験¹³⁾

1) 人工胃液耐性試験

L.paracasei および *L.casei* をそれぞれ MRS 培地で37℃、18時間静置培養した。塩酸で所定の pH (pH 2.0, pH 2.5, pH 3.0) に調整した0.32%ペプシン添加 MRS 培地 (人工胃液) に前培養した *L.paracasei* および *L.casei* を1%接種し、37℃で4時間培養した。培養開始後、直ちに培養液を採取し測定した菌数を0時間とした。1時間ごとに生菌数を測定した。

2) 人工胆汁耐性試験

所定の濃度 (0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%) の胆汁末含有 MRS 液体培地 (人工胆汁) に、MRS 培地で37℃、20時間培養した *L.paracasei* および *L.casei* を1%接種し、37℃、20時間培養した後、濁度 (600 nm) を測定した。

(3) 腸内細菌との混合培養試験

1) 供試菌株および培養

乳酸菌は *L.paracasei* と、比較対照菌株として *L.casei* を使用した。腸内細菌は *E.coli* (NBRC 3301), *Bacteroides vulgatus* (NBRC 14291), *Clostridium beijerinckii* (NBRC 103909) の3種類を、NBRC より購入した。*E.coli* は EC 培地 (ハイポリペプトン1%, 酵母エキス0.2%, 硫酸マグネシウム七水和物0.1%), *B.vulgatus* は GAM 培地 (日水製薬株式会社, 東京), *C.beijerinckii* は強化クロストリジア培地 (関東化学株式会社, 東京) で37℃、24時間前培養した後、培養液2 mLを遠心分離 (2,000 × g, 3分) して菌体を回収し、滅菌水を加えて吸収波長660 nm で OD 0.9~1.3 ($10^4 \sim 10^6$ cfu/mL) になるように調製した。

2) 培養条件および生菌数の測定

混合培養は、*L.paracasei* と腸内細菌、*L.casei* と腸内細菌、腸内細菌のみの3群で行った。*L.paracasei*, *L.casei*, *E.coli*, *B.vulgatus*, *C.beijerinckii* を $10^4 \sim 10^6$ cfu/mL の濃度になるようファルコンチューブに入れた10%還元脱脂乳-0.1%酵母エキス培地40 mLに接種した。比較対照のため、*E.coli*, *B.vulgatus*, *C.beijerinckii* のみを接種した培養液を対照群とした。3種類の腸内細菌はそれぞれ37℃で8時間、24時間および48時間培養した。乳酸菌

数の測定には、MRS 寒天培地を使用し、37℃で48時間嫌気培養を行った。また、*E.coli* の測定には EC 寒天培地を使用し、37℃で48時間好気培養を行った。*B.vulgatus* の測定は GAM 寒天培地、*C.beijerinckii* の測定は強化クロストリジア寒天培地を使用し、それぞれ37℃で48時間嫌気培養を行った。

3) 培養液の pH および乳酸濃度の測定

培養液の pH は培養後 0, 8, 24, 48時間目に pH メーター (HORIBA F-52, 堀場製作所, 京都) を用いて測定した。乳酸濃度の測定は同時間の培養液を採取し、Lactate Assay Kit-WST (株式会社同仁化学研究所) を使用し測定した。

(4) マウスの盲腸内容物の分析

1) 供試菌株および培養

L.paracasei を MRS 培地で37℃, 20時間前培養した。培養液 1 mL を新たな MRS 液体培地に接種し、37℃で48時間静置培養した。培養後、培養液を遠心分離 (1,500 × g, 10分) して菌体を回収し、滅菌水で 2 回洗浄した後、吸収波長 660 nm で OD が 0.85 になるように調製し、乳酸菌飲料水とした。これは、菌体乾燥重量として 0.35 µg/mL (10⁶ cfu/mL) に相当する生菌数である。

2) 実験動物および飼育方法

実験には、3 週齢雌の ICR マウス 12 匹を三協ラボサービス株式会社より購入して用いた。マウスは、室温 22 ± 1℃, 湿度 50%, 明暗サイクル 12 時間 (明期 7:00 ~ 19:00) の環境下においてプラスチックケージで個別飼育した。市販固形飼料 (MF, オリエンタル酵母株式会社) で 1 週間の予備飼育後、AIN-93G に従い調製した飼料¹⁴⁾ と水あるいは乳酸菌飲料水を自由に摂取させた。1 群 6 匹の 2 群に分けコントロール (CO) 群, 乳酸菌 (LB) 群とした。LB 群には、乳酸菌飲料水を自由に摂取させた。乳酸菌飲料水は 2 日に一度交換した。飼育開始から 4 週間後イソフルラン麻酔下で解剖し、盲腸を採取した。重量を測定し、フリーザー内 (-80℃) で冷凍保存した。

動物実験は、聖徳大学動物実験指針に基づき、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成18年, 環境省告示第八十八号)」を遵守して行った。

3) 有機酸の測定

盲腸内容物 0.1 g を 15 mL のファルコンチューブに取り、70% エタノール 5 mL を加えて攪拌し、ろ過したものを抽出液とした。抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。その後、3 mmol/L 過塩素酸水溶液 (和光純薬工業株式会社, 精密分析用) に溶解後、2 mL に定容し 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過し試験液とした。それを高速液体クロマトグラフィー (HITACHI UV L-7405) に供した。分析条件は、カラム; Gelpack GL-C610H-S (7.8 mm I.D. × 300 mL, 日立化成工業株式会社), カラム温度; 60℃, 溶離液; 3 mmol/L 過塩素酸水溶液, 反応試薬; 0.1 mmol/L ブロムチモールブルー

(BTB) 溶液, 流速; 0.5 mL/分, 検出波長; VIS 440 nm, 試料の注入量; 20 µL とした。分析後、絶対検量線法により試料濃度を算出した。標準試料は乳酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, n-酪酸を用いた。

(5) 統計処理

人工胆汁耐性試験の濁度および盲腸内容物の有機酸量は、平均 ± 標準偏差 (mean ± SD) で表した。2 群間の比較は、Student's *t*-test にて検定を行った。*p* < 0.05 で有意差ありと判定した。ソフトはエクセル統計 2012 for Windows (株式会社社会情報サービス) を用いた。

3. 結 果

(1) コレステロールおよび胆汁酸吸着試験

コレステロール吸着試験, 胆汁酸吸着試験の結果、いずれも *L.paracasei* が *L.casei* より高い吸着率を示した (表 1)。

表 1 乳酸菌のコレステロールおよび胆汁酸吸着作用 (*n* = 2)

Strain	コレステロール吸着 (%)	胆汁酸吸着 (%)
<i>L.casei</i>	39.4	33.8
<i>L.paracasei</i>	50.9	40.9

(2) 人工消化液耐性試験

人工胃液耐性試験の結果、*L.paracasei* と *L.casei* は pH 3.0 の人工胃液で培養 4 時間後まで生存していたが、pH 2.0 では生菌数は測定できなかった (図 1)。*L.casei* は培養開始時には pH 2.5 ですがすでに 10³ cfu/mL と減少しており、2 時間後には菌数が検出されなかった。*L.paracasei* は、培養開始時は pH 2.0 ~ 3.0 において 10⁶ cfu/mL 残存していた。その後、菌数が減少したものの pH 2.5 と pH 3.0 の条件下では 10⁵ cfu/mL の生菌数が認められた。

人工胆汁耐性試験の結果を表 2 に示した。胆汁末濃度 0.1% において、*L.paracasei* の耐性は *L.casei* に比較して有意に高かった (*p* < 0.05)。胆汁末濃度 0%, 0.2%, 0.3% では、2 群間において有意な差はみられなかった。

(3) 腸内細菌との混合培養試験

E.coli の生菌数はいずれも培養後 8 時間で 10⁸ cfu/mL となり定常期に達したが、*E.coli* + *L.casei* の培地のみ培養後 48 時間で 10⁵ cfu/mL まで減少した (図 2 (a))。*E.coli* + *L.paracasei* と *E.coli* + *L.casei* の乳酸菌数は、2 群間で差はみられなかった (図 2 (b))。培養液の pH はいずれも経時的に減少したが、24 時間以降は *E.coli* と *E.coli* + *L.paracasei* が pH 5.0 以下に下がらなかったのに対し、*E.coli* + *L.casei* が 48 時間後に pH 4.0 まで低下した (図 2 (c))。培養液の乳酸濃度は *E.coli* + *L.casei* が pH の低下に伴い 98 mmol/L まで増加した (図 2 (d))。

B.vulgatus の生菌数は、*B.vulgatus* + *L.paracasei* と

図1 人工胃液耐性試験における生菌数の変化

(a) *L. casei*, (b) *L. paracasei*
 ● pH3.0, ▲ pH2.5, ■ pH2.0

表2 人工胆汁耐性試験

Strain	OD ₆₀₀			
	0%	0.1%	0.2%	0.3%
<i>L. casei</i>	2.14 ± 0.03	0.43 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.01
<i>L. paracasei</i>	2.13 ± 0.02	1.25 ± 0.06*	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.00

平均値 ± 標準偏差 (n=3) *p<0.05

B. vulgatus + *L. casei* とともに、24時間をピークにいずれも減少した (図3 (a))。乳酸菌の生菌数は、いずれも培養後8時間で 10^7 cfu/mLまで到達し48時間後も菌数を維持していた (図3 (b))。培養液のpHは、*B. vulgatus* + *L. casei* のみが48時間後にpH 4.0付近まで低下した (図3 (c))。*B. vulgatus*, *B. vulgatus* + *L. paracasei* の乳酸濃度に経時的な変化はみられなかった。一方、*B. vulgatus* + *L. casei* の乳酸濃度は48時間で92 mmol/Lまで増加した (図3 (d))。

C. beijerinckii の生菌数は、*C. beijerinckii* と乳酸菌との混合培養液ともに24時間後に 10^7 cfu/mLに達し、その後減少した (図4 (a))。乳酸菌は、培養後24時間までは*C. beijerinckii* + *L. paracasei*, *C. beijerinckii* + *L. casei* どちらも増加したが、48時間後には低下傾向を示した (図4 (b))。培養液のpHは経時的に低下し、*C. beijerinckii* と*C. beijerinckii* + *L. paracasei* は48時間後にpH 5.0付近となり、*C. beijerinckii* + *L. casei* はpH 4.1を示した (図4 (c))。*C. beijerinckii* と*C. beijerinckii* + *L. paracasei* の乳酸濃度は低く、*C. beijerinckii* + *L. casei* が79 mmol/Lまで増加した (図4 (d))。

(4) マウスの盲腸内容物の分析

盲腸内容物中有機酸の分析の結果を表3に示した。CO群、LB群ともに、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸が検出された。LB群では、CO群では検出されなかった乳酸とイソ酪酸が検出された。LB群のn-酪酸は、CO群に対して有意に低値を示した ($p<0.05$)。酢酸、プロ

ピオン酸および有機酸総量は、2群間で有意な差はみられなかった。盲腸内容物中の有機酸量は、2群ともに酢酸が最も高い値を示した。

4. 考 察

L. paracasei のコレステロール吸着および胆汁酸吸着試験を行った。その結果、コレステロールと胆汁酸いずれも*L. paracasei* が*L. casei* より高い吸着率を示した。田中らはふなずしから分離した52菌株の*Lactobacillus* 属のコレステロール吸着試験を行い、生菌でのコレステロール吸着率が最も高い菌株は44.7%であったことを報告している⁷⁾。本研究における*L. paracasei* のコレステロール吸着率は50.9%であり、他の菌株の吸着率を上回っていた。前報の*In vivo* 試験において*L. paracasei* NFRI 7415の生菌での摂取は、高脂肪食マウスの血中コレステロール濃度を抑制するとともに肝臓組織の脂肪細胞を減少させることが示されている¹⁵⁾。体内のコレステロール低下の機序は、乳酸菌がコレステロールを吸着し体外に排泄するほかに、コレステロールを原料として肝臓で生成される胆汁酸の取り込みによる報告もされている¹⁶⁾。本菌株が生菌、死菌どちらに高い吸着能を示すのかは不明である。したがって、加熱死菌によるコレステロールと胆汁酸吸着作用についても検討する必要がある。

空腹時のヒトの胃内は、胃酸によってpH 1.0~2.0に保たれているが、肉や野菜を摂取するとpH 4.0~5.0以上に上昇する¹³⁾。通常、胃内消化物が完全に十二指腸まで移送されるのに約2時間要するとされていることから、

図2 乳酸菌と *E. coli* の混合培養における生菌数の変化

● *E. coli* ▲ *E. coli* + *L. paracasei* ■ *E. coli* + *L. casei*
 (a), (c), (d) *E. coli*, *E. coli* + *L. paracasei*, *E. coli* + *L. casei*
 (b) *E. coli* + *L. paracasei*, *E. coli* + *L. casei*

人工胃酸耐性試験の pH を 2.0~3.0, 培養時間を 4 時間とした。東らの報告によると, *Lactobacillus gasseri* NY0509 を 4 時間 37℃ で培養した結果, pH 3.0 の条件下では 10^7 cfu/mL と高い生残性を示したものの, pH 2.5 では 10^3 cfu/mL まで低下している¹³⁾。Jensen らは, 8 種類の乳酸菌の中で *Pediococcus pentosaceus* の人工胃液に対する生存率が最も高いことを報告している¹⁷⁾。本研究の人工胃液耐性試験において *L. paracasei* は pH 2.0 では死滅していたが, pH 2.5 では 10^5 cfu/mL と *L. gasseri* より高い生残性を示した (図 1 (b))。このことから, *L. paracasei* の高い人工胃液耐性能力が示唆された。

腸管内の胆汁濃度は最高値で 2% と報告されており, 胆汁濃度 2% は, 胆汁末濃度 0.2% に相当する¹³⁾。*Lactobacillus* 属 7 種類について, 胆汁末濃度を 0.12% の条件下で耐性試験をおこなったところ, *L. gasseri* と *L. rhamnosus* が 50~70% と高い生残性を示したと報告し

ている¹⁸⁾。本研究において胆汁末濃度を 0.3% まで設定し胆汁末 0% の濁度に対する乳酸菌の生存率を計算した結果, 胆汁末濃度 0.2% 以上の両菌株の生存率は 6.5~7% であった。胆汁末濃度 0.1% の生存率は, *L. casei* が 20.1%, *L. paracasei* は 58.7% であった。*L. paracasei* は, *L. gasseri* と *L. rhamnosus* とほぼ同等の生存率を示したことになる。*L. paracasei* を摂取させたマウスの糞中から同菌株が検出されたことから, 生きて腸に到達することが明らかとなっている¹⁹⁾。人工胆汁耐性試験の結果から, ふなずし由来乳酸菌は, 消化管内においても高い生存性を示すことが考えられた。

前述のとおり, ヒトの腸管内には 1,000 種類以上の腸内細菌が生息しており, 腸内細菌叢を構成している主要菌群は, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* などの嫌気性菌と大腸菌 (*E. coli*) である¹⁾。*Clostridium* は有害菌, 大腸菌と *Bacteroides*

図3 乳酸菌と *Bacteroides vulgatus* の混合培養における生菌数の変化

● *B. vulgatus* ▲ *B. vulgatus* + *L. paracasei* ■ *B. vulgatus* + *L. casei*
 (a), (c), (d) *B. vulgatus*, *B. vulgatus* + *L. paracasei*, *B. vulgatus* + *L. casei*
 (b) *B. vulgatus* + *L. paracasei*, *B. vulgatus* + *L. casei*

は日和見菌といわれており、哺乳類の腸内常在細菌の中に健康保持に働く乳酸菌を補うことが重要である^{1, 8)}。プロバイオティクスとして働く *Lactobacillus* 属の一部の菌種は、有機酸やバクテリオシンを産生し、栄養素の取り込みの競合などにより有害菌を排除して腸内細菌叢を正常化することが期待されている³⁾。腸内細菌との混合培養実験では、*E. coli* + *L. casei* の混合培養48時間後に *E. coli* の生育が抑制された (図2 (a))。 *L. casei* の乳酸産生により培養液の pH が低下し、*E. coli* を減少させたことが考えられた。一方、*Bacteroides* + *L. casei* と *Clostridium* + *L. casei* の混合培養の結果、共に pH の低下と乳酸濃度の上昇は認められたものの、*B. vulgatus* と *C. beijerinckii* の生菌数の明確な減少は見られなかった (図3 (a), 図4 (a))。 *L. gasseri* と *L. casei* の腸内有害菌抑制効果において、*E. coli* と *Clostridium* の増殖を抑制できなかった理由として、培養24時間以前に2つの乳酸菌の菌数がこれらの有害菌の増殖を抑制するのに必要な量に達してい

なかったためと述べている¹³⁾。24時間後の *L. gasseri* と *L. casei* の菌数はそれぞれ $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL に達しているのに対して、本研究の *L. casei* と *L. paracasei* の24時間後の菌数は、 $10^6 \sim 10^8$ cfu/mL にとどまっていた。しかしながら、48時間後の *E. coli* との混合培養における乳酸菌数は増加傾向にあることから、48時間以降も菌数の増加が推測される。 *L. paracasei* は菌体内でグルタミン酸を GABA に変換し、細胞外に放出する特徴を持っており、GABA 産産が培地中で確認できるのは定常期を過ぎた72時間以降であった⁵⁾。したがって、*L. paracasei* の有機酸生成は *L. casei* に比べると若干遅いのではないかと考えられた。

Lactobacillus は100%乳酸を産生するホモ発酵と、乳酸、酢酸、アルコールやガスを産生するヘテロ発酵に分類される²⁰⁾。本研究で用いた *L. paracasei* と *L. casei* はヘテロ発酵形式の乳酸菌である。腸管内で乳酸菌は食物繊維やオリゴ糖などの難消化性多糖を資化し、短鎖脂肪酸を産

図4 乳酸菌と *Clostridium beijerinckii* の混合培養における生菌数の変化
 ● *C. beijerinckii* ▲ *C. beijerinckii* + *L. paracasei* ■ *C. beijerinckii* + *L. casei*
 (a), (c), (d) *C. beijerinckii*, *C. beijerinckii* + *L. paracasei*, *C. beijerinckii* + *L. casei*
 (b) *C. beijerinckii* + *L. paracasei*, *C. beijerinckii* + *L. casei*

表3 盲腸内容物中の有機酸 (mg/g)

有機酸	CO	LB
乳酸	—	0.58 ± 0.35**
酢酸	1.02 ± 0.21	0.85 ± 0.25
プロピオン酸	0.25 ± 0.12	0.19 ± 0.05
イソ酪酸	—	0.43 ± 0.39**
n-酪酸	0.41 ± 0.10	0.19 ± 0.13*
TOTAL	1.68 ± 0.22	2.06 ± 0.86

CO: コントロール群, LB: 乳酸菌群

平均値 ± 標準偏差 (n=6) —: 検出せず * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

生し、蠕動運動を促すばかりでなく、腸内の pH を低下させる¹⁾。*Bacteroides* と *Clostridium* は乳酸を利用してプロピオン酸や酪酸を生成する²¹⁾。LB 群の盲腸内には CO 群では検出されなかった乳酸とイソ酪酸が検出されたため、*L. paracasei* が他の腸内細菌よりも優勢となっ

ていることが考えられた。本研究の腸内細菌との混合培養試験では、*L. paracasei* との混合培養の培地からほとんど乳酸が検出されなかったにもかかわらず、培養液の pH が低下していたことから、乳酸以外の有機酸を産生している可能性がある。これらのことから、ふなずし由来乳酸菌の摂取は、腸内において有機酸の増加をもたらす、腸内細菌叢に影響を及ぼすことが考えられる。

5. 要 約

L. paracasei NFRI 7415の、人工消化液耐性およびマウスの盲腸内の有機酸に及ぼす影響について調べた。

- (1) コレステロール吸着率は、*L. paracasei* が50.9%、*L. casei* が39.4%であり、胆汁酸吸着率は *L. paracasei* が40.9%、*L. casei* が33.8%であった。
- (2) 人工胃液耐性試験および胆汁耐性試験において、*L. paracasei* は胃液と胆汁に対する高い耐性を示した。

- (3) *E.coli*, *B.vulgatus*, *C.beijerinckii* の腸内細菌との混合培養試験の結果, *L.casei* との混合培養において *E.coli* の増殖を抑制したが, *L.paracasei* において3種類の腸内細菌の増殖抑制効果はみられなかった。
- (4) 3週齢のICRマウス(雄)をコントロール(CO)群, 乳酸菌(LB)群として4週間飼育のち解剖して盲腸を採取した。盲腸内容物中の有機酸を測定した結果, LB群では, 乳酸とイソ酪酸が検出されたが, CO群では検出されなかった。盲腸内で検出された有機酸は腸内細菌によって生成された代謝産物であり, *L.paracasei* がLB群の腸内細菌叢に影響を及ぼしていることが考えられた。

本研究の一部は, (独) 日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究(C))課題番号16K00919の支援を受けて実施した。

利益相反

利益相反に該当する事項はない。

文 献

- 上野川修一, 神谷茂: 食と健康のための免疫学入門, 京都健康フォーラム監修, 建帛社, p.14-20 (2012)
- 河津大輔, 大島直子, 奥積昌世, 藤井建夫: ラットの盲腸内容物と糞便の細菌叢および代謝産物の比較, 日本食品微生物学会誌, 11, 125-128 (1994)
- 上西寛司, 瀬戸泰幸: 乳酸菌の生理機能とその要因, 日本調理科学会誌, 46, 129-133 (2013)
- 辨野義己: 腸内環境学のすすめ, 岩波書店, p.38 (2008)
- Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimmura T: Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods, *Food Microbiol*, 22, 497-504 (2005)
- 小松崎典子, 海老原久実, 本多睦美, 植木幸英, 島純: ふなずし由来乳酸菌のマウスにおける糞中へのコレステロール排泄効果, 日本食生活学会誌, 25, 87-91 (2014)
- 田中(東)幸雄, 松村敦, 大野克利, 石畑公江, 米田幸生, 山田敏広: ふなずしからのコレステロール低下作用を有する乳酸菌の分離, 日本食品科学工学会誌, 56, 177-183 (2009)
- 高野俊明: 新しい乳酸菌の機能と応用, 上野川修一監修, シーエムシー出版, p.11-12 (2013)
- 武藤泰敏: 消化・吸収, 第一出版, p.153-154, 275 (2002)
- 藤井信, 畑添牧郎, 侯徳興, 真田宏夫, 大崎繁満, 檜作進: ラットの血清脂質, 脂肪組織重量, 盲腸重量および盲腸有機酸含量に対するL-アラビノースの効果, 応用糖質科学, 47, 355-361 (2000)
- 岸田太郎, 海老原清: 血漿脂質および盲腸内容物有機酸濃度に及ぼすビート食物繊維の粒度ならびにゲアガムの分子量の影響, 日本食物繊維雑誌, 2, 75-82 (1998)
- 高木尚紘, 北脇涼子, 西村侑子, 岩崎充弘, 都築公子, 堀内理恵, 福田満: 大豆乳酸発酵食品のラットにおける胆汁酸排泄促進効果, 日本食品科学工学会誌, 12, 597-601 (2008)
- 東幸雅, 伊藤和徳, 佐藤学: *Lactobacillus gasseri* NY0509 および *Lactobacillus casei* NY1301の人工消化液耐性並びに腸内有害菌抑制効果, 日本食品科学工学会誌, 48, 656-663 (2001)
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC: AIN-93 purified diet for laboratory rodents: final reports for the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet, *J Nutr*, 123, 1939-1951 (1993)
- Komatsuzaki N, Yamada Y, Ueki Y, Shima J, Morikawa S: *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 reduces liver lipid contents in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Int J Clin Nutr Diet*, 1, 108 (2016)
- 南田公子, 横田篤, 富田房男: 乳酸菌によるコレステロール低下作用, 食品と技術, 5, 1-7 (2005)
- Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L: In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 153, 216-222 (2012)
- Fuochi V, Petronio GP, Lissandrello E, Furneri PM: Evaluation of resistance to low pH and bile salts of human *Lactobacillus* spp. isolates. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 28, 426-433 (2015)
- Komatsuzaki N, Aoki-Yoshida A, Shima J: Effects of liver *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 on the intestinal immune system and intestinal microflora of mice. *Int J Biotechnol Food Sci*, 5, 56-62 (2017)
- 辨野義己: *Lactobacillus* 属の分類と同定, 食品と微生物, 8, 65-74 (1991)
- 渡部侑子: 腸内糖代謝と腸内細菌, 腸内細菌学会誌, 19, 169-177 (2005)