ラット盲腸内容物 pH, 短鎖脂肪酸濃度および細菌叢に対する ラクトスクロース投与の影響

米 山 勝*, 万 代 隆 彦*, 阿 賀 創*
藤 井 和 子*, 堺 修 造*, 新 谷 太 佳 子**
孟 崗**, 片山(須川)洋子**

* 株式会社林原生物化学研究所研究センター天瀬研究所

** 大阪市立大学生活科学部食品栄養科学科栄養生理学

Effect of Lactosucrose Feeding on Cecal pH, Short-Chain Fatty Acid Concentration and Microflora in Rats

Masaru YONEYAMA,* Takahiko MANDAI,* Hajime AGA,*
Kazuko FUJII,* Shuzo SAKAI,* Takako SHINTANI,**
Kou MOU** and Yohko KATAYAMA (SUGAWA)**

* Amase Institute, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama 700

** Department of Food and Nutrition, Faculty of Science of Living,
Osaka City University, Osaka 558

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 45, 109~115 (1992)

Rats were divided into eight groups and fed freely with semisynthetic diets containing 0%, 1% or 10% purified lactosucrose (LS-98) for 2 or 4 weeks. The pH of the cecal contents was reduced by feeding the rats with these LS-98 diets, and recovered to normal after a shift to a control diet. The concentration of short-chain fatty acids (SCFA) in the cecal contents was significantly increased by administration of LS-98, and decreased markedly after a shift to the control diet. Microbial examination revealed marked influences resulting from the administration of LS-98. Numbers of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Clostridium* sp. were increased, and the proportion of Bacteroidaceae decreased. The increase in the intestinal SCFA concentration appeared to stimulate epithelial cell growth in the intestine, as suggested by electron microscopical observation. The present findings in rats support previous results in humans indicating an increase of intestinal *Bifidobacterium* after intake of LS-98.

Key Words lactosucrose, intestinal microflora, short-chain fatty acid.

(Received July 8, 1991)

糖転移酵素によって調製したラクトスクロース¹⁾ (*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- α -D-glucopyranosyl β -D-fructofuranoside: 以下 LS と省略) は, その分子構造中にラクトース骨格ならびにスクロース骨格を有する三糖類である。高純度ラクトスクロース (以下 LS-98 と省略) の *in vitro* 消化性ならびに LS-55 (LS 純度 55%) の経口摂取によるヒト腸内細菌叢への影響が報告されている²⁾。それによると経口摂取した LS は上部消化管においてほとんど水解を受けず, 大部分が大腸に到達する

ことが示唆される。また, ヒトに対する経口的摂取において, 摂取期間中の糞便ビフィズス菌群占有率が顕著に上昇することが見いだされた。著者らは先に, LS-98 の機能特性を検索することを目的として, 健康成人への経口的摂取試験³⁾を実施し, ヒト糞便性状, ならびにヒト糞便細菌叢に及ぼす影響を調査した。LS-98 の経口的摂取は, ヒトの糞便性状には変化を与えないものの, 比較的小量の摂取でも糞便中ビフィズス菌群占有率の上昇をもたらすに有効であることを確認した。今回, ヒトを対象とした試験においては観察しがたい, 上部消化管通過後におけるラクトスクロースの挙動と機能を, ラットへ

* 〒700 岡山市天瀬南町 7-7

** 〒558 大阪市住吉区杉本 3-3-138

の経口投与後の盲腸内容物の性状、細菌叢の測定、ならびに消化管粘膜上皮組織の形態観察によって評価した。

実験方法

1. 糖 質

ラクトスクロースは、ラクトースとスクロースを材料として、*Arthrobacter* sp. K-1 の生産する β -フラクトフラノシダーゼの転糖移反応により酵素的に合成した。反応液中のラクトスクロース成分を、活性炭カラムクロマトグラフィーで精製した高純度ラクトスクロース試料 (LS-98) を本実験に用いた。本実験に使用した LS-98 は塩水港精糖 (株) より供与された。本試料の糖組成分析結果を Table 1 に示す。対照飼料に配合したグルコースは試薬特級品を用いた。

2. ラット経口投与試験

ラット経口投与試験は、LS を含まないコントロール飼料で1週間予備飼育した1群4匹で構成される4週齢SD 系雄ラット (日本クレア) を使用して行った。飼料中の LS 添加量の影響、飼料投与期間の影響、ならびに LS 投与中止の影響を検討するための各群を設けて本試験を実施した。コントロール飼料ならびに LS-98 添加飼料組成を Table 2 に示す。試験群は、同一飼料で2週間飼育する3群 (コントロール飼料群, 1% LS 飼料群, 10% LS 飼料群), 同一飼料で4週間飼育する3群 (コントロール飼料群, 1% LS 飼料群, 10% LS 飼料群), および両 LS 飼料で2週間飼育の後、コントロール飼料に切り替えた2種の復帰群の合計8群である。なお、実験期間中、飼料および水は自由に摂取させた。

3. 測定方法

各試験飼料の投与が終了したラット (1群4匹) は、エーテル麻酔下で開腹し、盲腸内容物の全量を取り出した。内容物重量を測定の後、既報に従って盲腸内容物の測定⁹⁾を行った。本研究では、pH 電極直接挿入法によ

る盲腸内容物の pH 測定、イオンクロマトアナライザーによる short-chain fatty acid (SCFA) 濃度測定、光岡の方法に準じた盲腸内容物の細菌叢測定⁹⁾、ならびに、グルコースをスタンダードに用いたアンスロン硫酸法による水溶性糖質濃度測定を行った。

4. 統計的検定法

本実験結果については、Student の *t*-test を用いて検定し、5% 以下、ならびに 1% 以下の危険率での有意差が認められた場合に、群間の平均値に差があると判定した。

実験結果および考察

1. ラット盲腸内容物の重量, pH, 水溶性糖質濃度

各群の盲腸内容物の重量, pH ならびに水溶性糖質濃度測定結果を Table 3 に示す。盲腸内容物の重量は、2週間ならびに4週間 LS 飼料を投与した群において増加を認めた。しかし個体差が大きいため、コントロール飼料群との比較において有意差は認められなかった。盲腸内容物の pH は、10% LS 飼料群において2週間飼育、4週間飼育ともに顕著な低値 (pH 5.7 前後) を示し、コントロール飼料群との比較で、ともに有意 ($p < 0.01$) な変化を観察した。1% LS 飼料群においても盲腸内容物の pH 低下は観察され、コントロール飼料群に対する

Table 1. Carbohydrate composition of Lactosucrose (LS-98) administered to experimental rats.

(%)			
Lactose	Sucrose	Lactosucrose	Others
0.38	0.18	97.36	2.08

Analysis was performed by HPLC using the ODS-column with the RI-detector.

Table 2. Composition of experimental diets.

(%)			
Ingredients	Control	1% LS-98 diet (1% LS)	10% LS-98 diet (10% LS)
Casein	20.0	20.0	20.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0
Mineral mix.*	5.0	5.0	5.0
Vitamin mix.**	2.0	2.0	2.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0
Corn starch	53.0	53.0	53.0
Glucose	10.0	9.0	—
LS-98	—	1.0	10.0

*,** Products of Oriental Yeast Co., Ltd.

Table 3. Effect of feeding LS-98 diets on cecum content's weight, pH and water soluble saccharide (WSS) concentration in rats.

Feeding periods	Diet	Weight (g/rat)	pH	WSS concentration (%)
2 weeks	Control	1.44±0.32	7.22±0.36	0.14±0.02
	1% LS	2.10±0.44	6.81±0.38	0.18±0.07
	10% LS	2.30±1.23	5.68±0.56 ^{b,c}	0.25±0.08 ^a
4 weeks	Control	2.24±0.48	7.36±0.20	0.17±0.01
	1% LS	2.58±0.34	6.99±0.15 ^a	0.17±0.03
	10% LS	3.52±1.49	5.70±0.21 ^{b,d}	0.47±0.35
	1% LS→Control	2.53±0.56	7.68±0.34 ^e	0.15±0.06
	10% LS→Control	2.49±0.42	7.35±0.38 ^f	0.13±0.03

Values are mean±SD of 4 rats. Significantly different from control group (^a $p<0.05$, ^b $p<0.01$), from 1% LS group (^c $p<0.05$, ^d $p<0.01$) and from 10% LS group (^e $p<0.01$), respectively.

変化は4週間飼育において有意 ($p<0.05$) であった。一方、LS 添加飼料で2週間飼育後、コントロール飼料に復帰させた両群の盲腸内容物は pH 7.5 前後で、コントロール飼料群と同レベルであった。1% LS 飼料投与からの復帰群盲腸内容物 pH は 1% 飼料群より、また、10% LS 飼料投与からの復帰群盲腸内容物 pH は 10% 飼料群より有意に高い値 ($p<0.01$) を示した。盲腸内容物中の水溶性糖質濃度は、10% LS 飼料群において高い値を示し、2週間飼育段階でコントロール飼料群との比較において有意差 ($p<0.05$) を認めた。以上の結果は、経口投与した LS-98 がラット上部消化管を通過し、盲腸部分に到達することを示唆している。経口投与を想定した LS の消化性は、ヒト唾液、人工胃液、ブタ膵臓 α -アミラーゼならびにラット小腸粘膜酵素系を用いた *in vitro* 水解試験⁶⁾において LS-98 を対象に検討されている²⁾。そのなかで、経口投与された LS-98 の 1.5% が人工胃液で、また、5.0% がラット小腸粘膜酵素系で加水分解を受けることが報告された。すなわち、摂取したラクトスクロースの一部は消化・吸収されるが、大部分は下部消化管に到達するものと推測され、本試験結果は *in vitro* 水解試験結果の妥当性を示すものと考えられる。ラット盲腸内に到達した LS は、生息する多量の腸内細菌によって利用されると考えられるが、盲腸内容物中の可溶性糖質濃度測定結果は、そこに到達した LS の速やかな利用性を示唆しており、大部分の LS は腸内細菌の菌体増殖および SCFA への変換によって消失したものと考えられる。一方、LS 投与中止後比較的短時間のうちに、腸内環境は投与以前の状態に復帰することが示唆された。

2. ラット盲腸内容物中の SCFA 濃度

ラット盲腸内容物の SCFA 濃度測定結果を Table 4

に示す。1% ならびに 10% LS 飼料投与群におけるラット盲腸内容物中の総 SCFA 濃度はいずれもコントロール飼料群より高い値を示し、前記盲腸内容物 pH 測定結果を反映している。1% LS 飼料群において総 SCFA 濃度の増加傾向、また 10% LS 飼料群において有意な増加 ($p<0.05$) が観察されたが、LS 投与期間の影響は認められなかった。LS 投与群の盲腸内容物 SCFA 濃度変化 (2週間飼育) は、1% LS 飼料群における *n*-酪酸濃度の有意な増加 ($p<0.05$)、ならびに 10% LS 飼料群の乳酸、*n*-酪酸の増加傾向に現れた。4週間同一飼料で飼育した場合も、2週間飼育系と同様な傾向を観察した。LS 投与を中止した復帰群では、乳酸、酢酸、*n*-酪酸の濃度低下が顕著であり、とりわけ 10% LS 飼料からの復帰群における乳酸の消失、ならびに 1% LS 飼料群からの復帰群における酢酸、プロピオン酸ならびに *n*-酪酸の著しい濃度低下を認めた。これらを反映して、LS 投与を中止した復帰群では、LS 投与群のみならずコントロール飼料群との比較においても総 SCFA 濃度低下が観察された。LS 投与時の乳酸ならびに *n*-酪酸濃度上昇は、乳酸産生菌ならびに *n*-酪酸産生菌の増加を示唆している。一方、LS 投与がもたらす盲腸内 SCFA 濃度上昇は、盲腸粘膜上皮組織の SCFA 吸収能力昂進に結びつき、その結果が LS 投与中止後における盲腸内容物の SCFA 濃度低下をもたらしたものと理解される。

この現象が、消化管粘膜上皮組織の形態変化と関連づけられるのではないかと考え、3種の飼料を4週間連続投与したラット消化管粘膜上皮組織 (回腸、盲腸および結腸部) を常法⁷⁾によって前処理し、走査型電子顕微鏡像を観察した。データとしては示していないが、LS 投与2群において盲腸と結腸の絨毛表面に多数の深い溝がみられ、goblet cell がコントロール群と比較して数多く

Table 4. Effect of LS-98 diets on short-chain fatty acid concentration of cecum contents of rats.

SCFA	(mg/g-cecum content)					
	2 weeks feeding			4 weeks feeding		
	Control	1% LS	10% LS	Control	1% LS	10% LS
Lactic acid	0.07±0.02	0.08±0.04	4.01±4.40	0.14±0.10	0.30±0.10	4.22±4.39
Acetic acid	2.39±0.26	2.50±0.47	2.31±0.39	2.24±0.21	2.71±0.48	2.45±0.67
Propionic acid	0.97±0.15	0.92±0.17	0.64±0.51	0.84±0.11	1.05±0.15	0.56±0.54
n-Butyric acid	0.64±0.33	1.67±0.51 ^a	1.19±0.89	0.90±0.36	1.05±0.29	1.39±1.24
Total acids	4.23±0.67	5.32±0.90	8.37±2.78 ^a	4.21±0.31	5.16±0.79	8.64±2.77 ^a

Values are mean±SD of 4 rats. Significantly different from control group (* $p<0.05$), from 1% LS group (* $p<0.05$, ^a $p<0.01$) and from 10% LS group (* $p<0.05$), respectively.

観察された。この微絨毛組織細胞の増殖傾向は、1% LS 群よりも 10% LS 群のほうが顕著であった。

先に述べた盲腸内容物の測定結果 (pH ならびに SCFA 濃度) は、ラクトスクロースの代謝が腸管内環境に及ぼす影響を示したものであるが、消化管粘膜上皮組織の形態観察結果は、ラクトスクロースの発酵によって腸管内に生成した SCFA を微絨毛組織がその増殖に利用した⁹⁾ことを示唆している。

3. ラット盲腸内容物の細菌叢

ラット盲腸内容物各菌群の菌数測定結果を Table 5 に、また各菌群の占有率算出結果を Table 6 に示す。1% ならびに 10% LS 飼料投与は、ラット盲腸内容物の細菌叢に変化をもたらしたが、とりわけ 10% LS 飼料投与群の変化が顕著であった。1% LS 飼料群は、コントロール飼料群と比較して、総菌数に変化は現れないものの、Bacteroidaceae の菌数ならびに占有率が低下し、占有率変化は 4 週間飼育後において有意 ($p<0.05$) となった。さらに、ラット盲腸内において数多く検出される *Clostridium* の占有率ならびに検出率が 1% LS 飼料群において上昇し、占有率変化は 4 週間飼育後において有意 ($p<0.05$) となった。2 週間飼育 (1% LS 飼料群) 後の SCFA 濃度測定において、*n*-酪酸濃度がコントロール群に対して有意 ($p<0.05$) に増加したが、他の主要 SCFA である酢酸、プロピオン酸の濃度変化は認められなかった。その際の、総菌数に占める *Clostridium* 菌比率が 9.1% から 21.0% に増加しており、糖質の主要発酵産物として *n*-酪酸を生成する *Cl. butyricum* の菌数増加が示唆された。なお、ラットと近似した腸内細菌叢を有するといわれているマウスにおいて、腸内フローラの構成の意義を検討した結果¹⁰⁾, *Clostridium* 菌群の、盲腸サイズを正常化したり、有害細菌の腸管内への定着を阻止する機能が認められている。10% LS 飼料投与群において、飼育期間に関係のない著しい総菌数増加を認め、コントロール群、1% 飼料群のいずれに対しても有意 ($p<0.01$) な変化を示した。この総菌数増加には、*Lactobacillus* および *Bifidobacterium* の菌数増加が大きく寄与している。*Lactobacillus* はラット腸内細菌としては優勢菌群であることが知られているが¹⁰⁾, 10% LS 投与後においては最優勢となった。一方、*Bifidobacterium* はコントロール群において少数 (2 週間飼育) もしくは検出限界以下 (4 週間飼育) であったが、2 週間、4 週間の 10% LS 飼料投与によって優勢菌群となるに至った。*Bacteroidaceae* 菌数は増加しているにもかかわらず、その占有率は低下し、1% LS 投与時と同様の変化をもたらした。LS 飼料投与を中止し、2 週間経過した復帰群の総菌数は、コントロール群と同一レベルにまで低下すると同時に、LS 投与で有意

Table 5. Cecum microflora of rats on feeding of LS-98 diets.

Microorganisms	2 weeks feeding			4 weeks feeding				
	Control	1% LS	10% LS	Control	1% LS	10% LS	1% LS→Cont.	10% LS→Cont.
Enterobacteriaceae	7.2±0.8 (4)	7.0±0.6 (4)	7.6±0.6 (4)	7.3±1.3 (4)	8.0±0.3 (4)	7.2±0.9 (4)	7.6±0.2 (4)	7.5±0.3 (4)
<i>Streptococcus</i>	7.0±1.1 (4)	7.3±0.4 (4)	7.1±1.2 (4)	6.1±0.8 (4)	6.1±0.5 (4)	5.7±0.8 (4)	6.2±1.3 (4)	6.7±0.6 (4)
<i>Staphylococcus</i>	4.1±0.8 (3)	3.7±0.1 (2)	0.0 (0)	2.4±0.3 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)	3.1±0.7 (2)	3.1±0.6 (3)
Yeast	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
<i>Lactobacillus</i>	8.5±0.5 (4)	8.6±0.1 (4)	9.9±0.4 (4) ^{b,d}	8.8±0.5 (4)	8.8±0.4 (4)	9.8±0.3 (4) ^{b,d}	8.8±0.6 (4)	8.8±0.6 (4) ^e
<i>Bifidobacterium</i>	7.5±0.5 (4)	8.1±0.4 (4)	9.3±0.5 (4) ^{b,e}	0.0 (0)	8.2±0.5 (4) ^b	9.4±0.4 (4) ^{b,d}	8.7 (1)	7.3±0.6 (3)
<i>Eubacterium</i>	8.1±0.6 (4)	8.7±0.3 (4)	9.4±0.1 (4) ^{b,d}	8.9±0.3 (4)	8.9±0.1 (4)	9.0±0.4 (3)	8.6±0.4 (4)	8.6±0.6 (4)
Bacteroidaceae	9.3±0.1 (4)	9.2±0.3 (4)	9.8±0.5 (4)	9.6±0.2 (4)	9.4±0.1 (4)	9.8±0.6 (4)	9.4±0.5 (4)	9.4±0.2 (4)
Peptococcaceae	8.2±0.3 (3)	8.4±0.4 (4)	8.8 (1)	8.4±0.5 (4)	8.5±0.2 (3)	8.8±0.6 (2)	8.4±0.5 (4)	7.5±1.3 (3)
<i>C. perfringens</i>	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
<i>Clostridium</i> others	8.4±0.6 (3)	8.8±0.7 (4)	9.1±0.4 (4)	8.6±0.6 (2)	9.2±0.2 (4)	9.1±0.5 (3)	8.9±0.6 (4)	8.1±0.9 (4)
<i>Veillonella</i>	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Total counts	9.5±0.1	9.6±0.2	10.4±0.1 ^{b,d}	9.8±0.2	9.8±0.1	10.4±0.2 ^{b,d}	9.7±0.5	9.6±0.3 ^e

Values are mean±SD of log No. of bacteria/g wet cecal content of 4 rats. Values in parentheses are the number of rats in which the indicated microflora were detected. Significantly different from control group (^b $p<0.01$), from 1% LS group (^c $p<0.05$, ^d $p<0.01$) and from 10% LS group (^e $p<0.05$), respectively.

Table 6. Composition of microorganisms in ceca of rats.

Microorganisms	2 weeks feeding			4 weeks feeding				
	Control	1% LS	10% LS	Control	1% LS	10% LS	1% LS→ Cont.	10% LS→ Cont.
Enterobacteriaceae	1.4	0.6	0.2	1.7	1.8	0.2	1.0	1.2
<i>Streptococcus</i>	1.2	0.6	0.2	<0.05	<0.05	<0.05	0.6	0.2
<i>Staphylococcus</i>	<0.05	<0.05	n. d.	<0.05	n. d.	n. d.	<0.05	<0.05
Yeast	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Lactobacillus</i>	13.0	11.3	39.6	17.2	11.8	34.3	13.2	17.8
<i>Bifidobacterium</i>	1.6	3.5	10.5	n. d.	3.5	16.6 ^a	0.8	0.7
<i>Eubacterium</i>	6.4	15.7	9.4	14.3	12.8	3.4 ^a	9.8	11.2
Bacteroidaceae	63.6	40.5	32.9	58.9	38.5 ^a	38.0	48.7	58.1
Peptococcaceae	3.7	6.8	0.5	4.2	4.4	2.0	6.0	2.1
<i>C. perfringens</i>	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Clostridium</i> others	9.1	21.0	6.7	3.7	27.2 ^a	5.6	19.9 ^a	8.7
<i>Veillonella</i>	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Values are mean of four rats. n.d., not detected. Significantly different from control group (^a $p < 0.05$)

に変化した盲腸内菌叢も、飼料中の LS 添加量に関係なくコントロール群とほとんど変わらない状態に復帰した。以上の結果は、盲腸内に到達した LS が、*Lactobacillus* ならびに *Bifidobacterium* 両菌群の増殖に対して、有効かつ速やかに利用されたことを示している。実験動物とヒトの消化管形態ならびに腸内細菌叢は異なっていることから、経口投与した LS の利用を同一レベルで論じることにはできないものの、ヒトの上部消化管を通過して大腸に到達した LS は、ラット盲腸内で発現したと同様、早期に乳酸菌群の増殖をもたらすものと考えられる。腸内細菌による LS の *in vitro* 資化性試験において、*Lactobacillus* はほとんど LS を利用しないことが報告されている¹¹⁾。また、著者らの健康成人に対する LS-98 の経口投与試験においても、糞便中 *Lactobacillus* の増殖をもたらすとの知見は得られなかった。しかしながら、本試験においてラットへの LS 経口投与が *Lactobacillus* の増殖に有効であったことは、多種類の細菌が共生する消化管内では、藤田らが報告したように²⁾、LS を直接利用できる *Lactobacillus* が存在するか、LS の加水分解産物として間接的に利用していることを示唆している。

実験動物へ LS を投与した本試験結果は、ヒトに対して LS-98 を経口投与した際の、大腸上部における LS の代謝の状況とその機能を予測させるとともに、糞便中の *Bifidobacterium* が増加した結果³⁾ を支持するものと考えられる。

要 約

高純度ラクトスクロース (LS-98) を 1% ならびに 10% 含有する飼料をラットに投与し、盲腸内における発酵代謝の状況、ならびに盲腸内細菌叢に与える影響を調査した。

ラクトスクロース含有飼料投与により、

- 1) 盲腸内容物重量は増加傾向を示した。
- 2) 盲腸内に到達したラクトスクロースの大部分は腸内細菌によって発酵代謝され、盲腸内容物の pH が低下するとともに内容物中の SCFA 濃度は上昇した。
- 3) 乳酸産生菌 (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) の菌数ならびに占有率の増加が観察された。
- 4) 盲腸ならびに結腸粘膜上皮細胞の増殖が顕像から推定された。

以上の観点から、ラクトスクロースは腸内細菌の主要生息部位において速やかに発酵代謝されるとともに、発酵代謝産物によって腸内環境を整える機能を有することが示唆された。

文 献

- 1) Feigold, D., Avigad, G. and Hestrin, S.: *J. Biol. Chem.*, **224**, 295 (1957)
- 2) 藤田孝輝, 原 耕三, 堺 修造, 三宅俊雄, 山下昌之, 恒富保彦, 光岡知足: 澱粉科学, **38**, 249 (1991)
- 3) 米山 勝, 万代隆彦, 阿賀 創, 藤井和子, 堺 修

- 造, 片山 (須川) 洋子: 栄食誌, 45, 101 (1992)
- 4) 米山 勝, 岡田勝秀, 万代隆彦, 阿賀 創, 堺 修造, 市川富夫: 澱粉科学, 37, 123 (1990)
- 5) 光岡知足: 腸内菌の世界, 53 (1984), 養文社 (東京)
- 6) 岡田勝秀, 米山 勝, 万代隆彦, 阿賀 創, 堺 修造, 市川富夫: 栄食誌, 43, 23 (1990)
- 7) 新津恒良, 平本幸男: 光学・電子顕微鏡実験法, 実験生物学講座 2, 229 (1983), 丸善 (東京)
- 8) Yajima, T. and Sakata, T.: *Bifidobacteria Microflora*, 6, 7 (1987)
- 9) 伊藤喜久治, 光岡知足, Freter, R.: 腸内フローラの研究方法論, 107 (1989), 学会出版センター (東京)
- 10) Morishita, Y. and Miyaki, K.: *Microbiol. Immunol.*, 23, 455 (1979)
- 11) 矢沢幸平, 南 善宏, 田村善蔵: 腸内フローラと食物因子, 15 (1984), 学会出版センター (東京)
(1991 年 7 月 8 日受理)