研究ノート

健康成人の腸内菌叢に及ぼす テアンデロース含有オリゴ糖摂取の影響

下川 久 俊*, 神田健太郎*, 渡部 恂子**

竹田 裕彦*, 浜 健二*

* 旭化成工業株式会社食品事業部
食品技術研究グループ

** カルピス食品工業株式会社
腸内フローララボラトリー

Effects of Oligosaccharide Containing
Theandrose on Intestinal Microflora
in Healthy Humans

Hisatoshi SHIMOKAWA,* Kentarou KANDA,*
Junko WATABE,** Yasuhiko TAKEDA*
and Kenji HAMA*

*Foods Research Group, Foods Division,
Asahi Chemical Industry Co., Ltd.,
Nobeoka 882

**Intestinal Flora Laboratory,
The Calpis Food Industry Co., Ltd.,
Sagamihara 229

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn.
Soc. Nutr. Food Sci.) 48, 57~60 (1995)

The effects of oligosaccharide containing theandrose (TR-32) on fecal microflora and properties were studied in healthy volunteers, who consumed TR-32 containing 4.0, 3.0 or 2.0 g theandrose daily for 21 days. No significant change was observed in fecal moisture content, but a slight change occurred in the fecal pH value during intake of theandrose. Fecal microflora examination showed that the counts and the ratio of *Bifidobacterium* were significantly changed by a daily intake of 4.0 or 3.0 g theandrose. A tendency for an increase of fecal *Bifidobacterium* was observed during administration of 2.0 g of theandrose.

Key Words theandrose, fecal microflora, *Bifidobacterium*.

(Received August 8, 1994)

* 〒 882 延岡市旭町 6-2700

** 〒 229 相模原市淵野辺 5-11-10

近年、微生物起源の加水分解酵素、糖転移酵素を応用した各種オリゴ糖が開発され¹⁾²⁾、それらの機能特性に関する研究が進行している。

著者らは、*Mucor javanicus* の生産する α -グルコシダーゼの糖転移反応³⁾によって、スクロースとマルトオリゴ糖から *O*- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside の構造を有するテアンデロース (theandrose, TR と省略) が、工業的規模において生産可能⁴⁾であることを示すとともに、TR の *in vitro* 消化性および腸内常在細菌による資化性を報告している⁵⁾。それによると、経口摂取した TR は、唾液アミラーゼ、胃酸および膵液アミラーゼではほとんど水解を受けず、小腸で一部が消化され、残りは消化されずにそのまま大腸に到達する可能性を示唆している。また、腸内常在細菌による *in vitro* 資化性試験において、TR が選択的に *Bifidobacterium* に利用されることを明らかにしている。

今回われわれは、TR の機能特性を検索することを目として、健康成人がテアンデロース含有オリゴ糖 (テアンデロース純度 32%, 以下 TR-32 と省略) を経口摂取したときの腸内フローラおよび糞便の性状に及ぼす影響を調査した。

実験方法

1. テアンデロース含有オリゴ糖の調製

試験に用いた TR-32 は、スクロースとマルトオリゴ糖を原料にして、*Mucor javanicus* の生産する α -グルコシダーゼの糖転移反応により酵素的に合成した。反応液中の単糖成分を、酵母に資化させることにより除去したのち、活性炭脱色、脱塩、濃縮して得られたもので、その糖組成は、スクロース 57%, エルコース 3%, TR 32%, その他のオリゴ糖 7% である。

2. 摂取スケジュール

本研究はヘルシンキ宣言の精神に則り、十分な配慮の下に施行したものである。

試験は、健康成人 17 名の協力により実施した。摂取量は、1 日当り TR 含量として、4.0, 3.0 および 2.0 g を含む TR-32 の 3 段階摂取を設定した。TR 4.0 g 摂取試験系は、被験者 7 名 (平均年齢 29.4 歳) を対象とし、TR-32 摂取期間を 3 週間、それに引き続く回復期間を 2 週間とする計 5 週間を試験期間とした。一方、TR 3.0 g 摂取試験系は被験者 5 名 (平均年齢 31.7 歳) を、また、TR 2.0 g 摂取試験系も被験者 5 名 (平均年齢 30.8 歳) を対象とし、試験スケジュールは TR 4.0 g 系と同一に設定した。TR-32 摂取直前、摂取開始 1 週間目、3 週間目および摂取

中止2週間後に各被験者から糞便を採取し、光岡らの方法⁶⁾に準拠して糞便フローラおよび糞便のpH、水分量の測定を行った。

3. 糞便フローラの測定

採取した検体1gを秤量し、ただちに9mlの嫌気性希釈液を含む中型試験管に移し、酸素不含、無菌炭酸ガス通気下でよく混和し、その1mlを新しい希釈液9mlに加え、上記の炭酸ガスを吹き込みながら同様に 10^{-8} 倍の濃度まで希釈し、順次、希釈液の0.05mlを嫌気性菌用平板8種類、好気性菌用(LBSを含む)平板7種類に様に塗抹した。嫌気性菌用平板は、還元スチールウールとともにジャーに入れ雰囲気炭酸ガスで置換して37°Cで72時間、嫌気培養した。また、DHL, TS培地は、37°Cで24時間好気培養、TATAC, PEES, P, NAC培地は37°Cで72時間好気培養した。LBS培地については、ジャーに入れ、還元スチールウールを入れずに、雰囲気炭酸ガスで置換して37°Cで72時間微好気培養した。培養終了後、集落の形成、グラム染色性、細胞の形態によって菌群を決定して集計した。

4. 糞便pHの測定

糞便適量をカップに採り、フラット型pH電極(Toko Chemical製)を用いて直接糞便のpHを測定した。

5. 糞便中の水分の測定

糞便約1gを、恒量を測定したアルミカップに精秤し、減圧下105°C、8時間真空乾燥後、デシケータ内で室温まで冷却、重量を測定し、水分含量を算出した。

6. 統計的検定法

本試験結果については、paired *t*-検定により、TR-32摂取期間中の平均値を、摂取前および摂取中止後の平均値と比較し、有意差を判定した。

実 験 結 果

1. 腸内フローラの変動

TR 4.0 g/日のTR-32摂取試験における被験者の糞便フローラの測定結果をTable 1に示した。試験期間中の総菌数レベルに変化は認められなかった。TRを4.0 g/日、1週間ならびに3週間連続摂取することにより *Bifidobacterium* 菌数の著しい上昇が観察され、摂取前と

Table 1. Changes in fecal microflora of healthy volunteers by intake of theaandrose (4 g/day) ($n=7$).

Organisms	Before administration	During administration		Two weeks after administration
		After 1st week	After 3rd week	
Enterobacteriaceae	7.4±0.8(100)	7.0±1.9(100)	7.0±2.1(100)	6.5±1.4(100)
<i>Streptococcus</i>	7.1±0.7(100)	7.2±1.5(100)	7.2±0.9(100)	7.5±2.1(100)
<i>Staphylococcus</i>	4.0±1.5(71)	3.1±0.4(71)	2.7±0.2(57)	3.0 (14)
Yeast	4.1 (14)	3.7±0.1(29)	3.6 (14)	3.1 (14)
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	—
<i>Corynebacterium</i>	4.1 (14)	4.7 (14)	4.3 (14)	4.1 (14)
<i>Bacillus</i>	7.5±1.8(43)	4.6 (14)	—	6.3 (14)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	—
<i>Lactobacillus</i>	4.8±1.8(100)	6.2±2.8(100)	6.6±2.0(100)	5.4±2.3(100)
<i>Bifidobacterium</i>	9.7±0.4(100)	10.1±0.3(100)*	10.2±0.4(100)*	10.1±0.5(100)
<i>Eubacterium</i>	9.6±0.4(100)	9.7±0.6(100)	9.7±0.3(100)	9.2±1.3(100)
Bacteroidaceae	10.4±0.3(100)	9.8±0.9(100)	10.3±0.3(100)	10.3±0.3(100)
<i>B. fragilis</i> group	9.0±0.7(100)	7.9±1.8(100)	9.3±0.6(100)	9.2±0.9(100)
<i>Fusobacterium</i>	7.6±0.3(71)	5.6±2.0(57)	8.1±0.7(43)	5.3±0.9(71)
<i>Megamonas hypermegas</i>	8.0±0.9(29)	8.8 (14)	9.0±0.4(29)	9.4 (14)
<i>Mitsuokella</i>	8.0 (14)	9.3 (14)	8.8±0.7(29)	8.5±0.2(29)
<i>Peptostreptococcus</i>	8.9±0.8(100)	9.1±1.6(71)	9.6±0.5(86)	9.7±0.1(71)
<i>Clostridium</i>	9.0±0.4(86)	7.5±2.8(86)	9.1±0.5(86)	8.9±0.8(100)
Lecithinase (—)	9.0±0.4(86)	9.2±0.2(57)	9.1±0.5(86)	8.9±0.8(100)
Lecithinase (+)	4.6±0.6(43)	4.2±1.8(71)	4.3±2.8(29)	3.3±1.4(29)
<i>Veillonella</i>	7.5±1.8(43)	4.8±2.2(43)	6.5±2.3(57)	5.4±3.4(57)
<i>Megasphaera</i>	5.8±2.1(29)	6.9 (14)	7.2±1.2(43)	5.2±3.7(29)
Total Aerobes	8.0±0.9(100)	8.1±1.8(100)	8.1±1.5(100)	8.0±1.4(100)
Total Anaerobes	10.6±0.3(100)	10.6±0.2(100)	10.7±0.3(100)	10.7±0.4(100)
Total	10.6±0.3(100)	10.6±0.3(100)	10.7±0.3(100)	10.7±0.4(100)

Mean±S.D. of log No. of bacteria/g wet feces (% : Frequency of occurrence). * Significant difference from the counts before administration : $p<0.01$.

Fig. 1. Compositional changes of fecal microflora by the administration of the various amounts of theanderose in healthy volunteers.

Values are means of five or seven volunteers. ■, *Bifidobacterium*; ▨, *Bacteroidaceae*; □, Others.

* Significant difference from the counts before administration: $p < 0.05$.

Table 2. Changes in fecal counts of *Bifidobacterium* of healthy volunteers by intake of theanderose (3.0, 2.0 g/day) ($n=5$).

	Theanderose dosage (g/day)	
	3.0	2.0
Before administration	$9.6 \pm 0.4(100)$	$9.5 \pm 0.9(100)$
A week administration	$10.2 \pm 0.4(100)$	$9.8 \pm 0.5(100)$
Three weeks administration	$10.3 \pm 0.5(100)^*$	$9.7 \pm 0.4(100)$
Two weeks after administration	$9.8 \pm 0.4(100)$	$9.5 \pm 0.2(100)$

Mean $\pm$ S.D. of log No. of *Bifidobacterium*/g wet feces (% : Frequency of occurrence). * Significant difference from the counts before administration: $p < 0.05$.

比較してその変化は有意 ($p < 0.01$) であった。

また、糞便中の総菌数に占める各菌群の割合の変化を Fig. 1 に示す。TR 4.0 g/日において *Bifidobacterium* 占有率は、摂取期間中上昇して 30~40%前後に達し、摂取前との比較において有意 ($p < 0.05$) な変化を観察した。一方、腸内腐敗発酵菌とみなされる *Bacteroides* 菌⁹⁾ は摂取前、その占有率は 56%であったのに対し、TR 4.0 g/日摂取群では、摂取期間中 30~40%に有意 ($p < 0.01$) に低下した。

さらに、TR 3.0 および 2.0 g/日の TR-32 経口摂取試験における被験者の糞便中の *Bifidobacterium* 菌数の推移を Table 2 に、また、その糞便中の *Bifidobacterium* 占有率の変化を Fig. 1 に示した。TR 3.0 g/日において、摂取期間中に明らかな *Bifidobacterium* 菌数および占有率の上昇が観察され、摂取前と摂取 3 週間後との比較においてその変化は有意 ($p < 0.05$) であった。試料の摂取

中止にともない、投与前のレベルまで低下した。また、TR 2.0 g/日においても摂取期間中 *Bifidobacterium* 菌数および占有率の明らかな上昇傾向が観察され、摂取中止にともなって低下した。

2. 糞便 pH の変動

TR 4.0, 3.0, 2.0 g/日の TR-32 摂取試験における被験者の糞便 pH 測定結果を Table 3 に示した。糞便中の pH は試験期間中 6 前後で推移したが、TR 4.0, 3.0 g/日の摂取期間中 pH は低下傾向を示した。

3. 糞便中の水分の変化

Table 4 に試験期間を通しての糞便中の水分量の変化を示した。糞便中の水分量は試験期間中 77%前後で推移したが、TR 4.0, 3.0 g/日の摂取期間中に、わずかながら水分含量が高くなる傾向がみられた。

Table 3. Effects of the various amounts of theanderose administration on fecal pH of human volunteers.

	Theanderose dosage (g/day)		
	4.0	3.0	2.0
Before administration	6.3±0.5	6.3±0.7	6.5±0.4
A week administration	5.9±0.4	5.8±0.4	6.1±0.1
Three weeks administration	6.1±0.6	6.0±0.5	6.3±0.5
Two weeks after administration	6.3±0.6	6.2±0.8	6.2±0.3

Values are expressed as mean±S.D.

Table 4. Effects of the various amounts of theanderose administration on fecal moisture contents (%) of human volunteers.

	Theanderose dosage (g/day)		
	4.0	3.0	2.0
Before administration	77.4±8.1	75.4±8.4	77.4±9.0
A week administration	79.0±9.6	78.3±8.6	77.0±7.2
Three weeks administration	77.5±7.8	76.0±7.5	77.1±9.6
Two weeks after administration	77.9±8.3	79.2±10.0	78.3±5.8

Values are expressed as mean±S.D.

考 察

TR は蜂蜜⁷⁾や砂糖きび汁⁸⁾に存在し、ヒトの摂食経験豊富なイソマルトースおよびシュクロースを分子構造としてもつ糖質であり、食品として好適である。

今回の試験において、ヒトがTRを摂取することによって糞便中の水分含量は、わずかではあるが増加する傾向がみられ、また、糞便中のpHは低下する傾向を示した。本試験での糞便pHの低下傾向は、摂取したTRの一部が大腸に到達し、発酵を受け、短鎖脂肪酸が生成されたことを示唆していると考えられる。短鎖脂肪酸の生成は糞便水分量の増加と相まって、結腸運動を刺激し腸内容物の排出を促進する効果⁹⁾を示す可能性があると考えられる。

TRを摂取した際の糞便フローラの変化をみると、TRを毎日摂取することにより腸内フローラを構成する菌群のうち、*Bifidobacterium*の有意な増加が認められた。一方、病原性や腸内腐敗発酵に関係する¹⁰⁾¹¹⁾といわれている *Bacteroides* 菌や *Clostridium* 菌は、摂取期間中増えることはなかった。このようにTRを摂取することによりビフィズス菌は選択的に増加することから、TRは腸内フローラの改善に有効であることが明らかになった。

要 約

健康成人にTR-32をTR分として4.0, 3.0および2.0 g/日をおのおの、3週間摂取させ、腸内フローラおよ

び糞便の性状に及ぼす影響について検討した。その結果、糞便pHは、摂取期間中低下傾向を示し、糞便中の含水量はわずかではあるが、増加傾向を示した。また、TRを4.0, 3.0 g/日摂取した場合、*Bifidobacterium*の菌数ならびに占有率は著しく上昇し、有意な変化を示した。さらに2.0 g/日のTR摂取によっても、明らかな*Bifidobacterium*の菌数および占有率の増加傾向が観察された。TRの摂取を中止することで糞便フローラは摂取前の状態にほぼ復帰した。

これらの結果から、TRは、健康成人にとってビフィズス菌増殖因子として寄与することが明らかとなった。

文 献

- 1) 日高秀昌, 柴田俊章, 足立 堯, 斎藤安弘: 農化, 61, 915 (1987)
- 2) 松本圭介, 小林洋一, 田村なつ子, 渡辺常一, 菅 辰彦: 澱粉科学, 36, 123 (1989)
- 3) 鈴木幸雄: 澱粉科学, 35, 93 (1988)
- 4) 竹田裕彦, 清水俊雄: 公開特許公報, 平 2-128695
- 5) 下川久俊, 竹田裕彦, 和田光一, 清水俊雄: 栄養誌, 46, 69 (1993)
- 6) 光岡知足: 腸内菌の世界, 15 (1980), 養分社 (東京)
- 7) Siddiqui, I.R. and Furgala, B.: *J. Apic Res.*, 7, 51 (1968)
- 8) Morel du Boil, P.G.: *Int. Sugar J.*, 94, 90 (1992)
- 9) Yajima, T. and Sakata, T.: *Bifidobacteria Microflora*, 6, 7 (1987)
- 10) 光岡知足: 腸内細菌学, 87 (1990), 朝倉書店 (東京)
- 11) Mitsuoka, T.: *J. Ind. Microbiol.*, 6, 263 (1990)

(1994年8月8日受理)