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

東 幸雅*・伊藤和徳*・佐藤 学*

Simulated Digestive Juice Tolerance and Inhibitory Effect on Harmful Intestinal Bacteria of *Lactobacillus gasseri* NY0509 and *Lactobacillus casei* NY1301

Yukimasa AZUMA* Kazunori ITO* and Manabu SATO*

*Central Research Institute, Nissin Food Products Co., Ltd., 2247, Noji-cho, Kusatsu-shi, Shiga 525-0055

In the present study, we investigated the tolerance of *Lactobacillus gasseri* NY0509 and *L. casei* NY1301 against simulated digestive juice *in vitro*, and the inhibition of growth of harmful intestinal bacteria, *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* by these bacteria. In the tolerance test of the gastric juice (containing 0.04% pepsin), the viable cell counts of both *L. gasseri* NY0509 and *L. casei* NY1301 maintained these initial levels in pH 3.0 for up to 4 hrs. In the bile tolerance test, *L. casei* NY1301 could grow in 0.3% oxgall, and *L. gasseri* NY0509 also showed bile tolerance. When *L. gasseri* NY0509 and/or *L. casei* NY1301 were mixed-cultured with *E. coli* JCM 1649^T or *C. perfringens* JCM 1290^T, the viable cell counts of *E. coli* JCM 1649^T and *C. perfringens* JCM 1290^T were remarkably decreased, respectively. These results suggest that *L. gasseri* NY0509 and *L. casei* NY1301 reach the intestine alive after ingestion, and inhibit harmful intestinal bacteria.

(Received Mar. 16, 2001 ; Accepted Jun. 7, 2001)

ヒト腸内菌叢のバランスはヒトの健康と深く関連し、その中で腸内有益菌であるビフィズス菌などを優勢に保つことがヒトの健康にとって望ましいと考えられている¹⁾。*Lactobacillus* GG²⁾, *L. casei* Shirota³⁾, *L. johnsonii* Lal⁴⁾などの乳酸菌類の摂取がヒト腸内菌叢を改善することが報告されており、「宿主の腸内菌叢のバランスを改善することにより、宿主に有益な作用をもたらすような、経口摂取する生きた微生物」をFULLERはプロバイオティクスと提唱した⁵⁾。

最近、著者らは*L. gasseri* NY0509および*L. casei* NY1301により発酵調製した乳酸菌飲料を摂取した健康成人において、糞便中ビフィズス菌の増加、腸内有害菌*Clostridium perfringens*の検出率の低下、糞便性状の改善、排便回数および排便量の増加など、腸内菌叢ならび

に排便状況に対し改善作用を示すことを報告した^{6,7)}。これらの結果より*L. gasseri* NY0509および*L. casei* NY1301も新規なプロバイオティクスとして機能することが示唆された。また、この乳酸菌飲料摂取時に糞便中*L. gasseri*の増加、ならびに摂取前では検出されなかった*L. casei*が摂取時に検出されたことから、乳酸菌飲料に含まれていたこれらの*Lactobacillus* 2菌株が生きて腸管まで到達した可能性が考えられた⁶⁾。

本研究では、既報において示された*L. gasseri* NY0509および*L. casei* NY1301が生きて腸管に達した可能性⁶⁾を検証することを目的として、これら2菌株の*in vitro*における人工消化液耐性(酸耐性および胆汁耐性)を検証した。また、既報において認められたこれらの*Lactobacillus* 菌株を用いて発酵調製した乳酸菌飲料

* 日清食品(株)中央研究所 (〒525-0055 滋賀県草津市野路町 2247)

による腸内菌叢改善作用⁶⁾の作用機序説明の一環として、*in vitro*における両菌株のヒト腸管内有害菌種、*C. perfringens* および *Escherichia coli* の生育に対する抑制効果の検討を行った。

実験方法

1. 供試菌株

L. gasseri NY0509, *L. casei* NY1301, *C. perfringens* JCM 1290^T および *E. coli* JCM 1649^T を使用した。*Lactobacillus* 2 菌株は、日清ヨーク(株)開発研究所(埼玉県羽生市)より分与された。*C. perfringens* および *E. coli* は、理化学研究所微生物系統保存施設(埼玉県和光市)より入手した。

2. 人工消化液耐性試験

(1) 人工胃液耐性試験

L. gasseri および *L. casei* を MRS 培地 (Lactobacilli MRS Broth: Difco Laboratories 製) に接種し、アネロバックケンキ® (三菱ガス化学(株)製) を用いて、嫌気条件下、37℃ で 18 時間培養し、前培養液とした。所定の pH に調整し、0.04% ペプシン (Sigma 製) を添加した MRS 培地 (人工胃液) に各菌株の前培養液を 1% (v/v) 接種し、37℃ で 4 時間まで培養、生菌数を経時的に測定した。生菌数の判定には、BCP 加プレートカウント寒天培地 (栄研化学(株)製) を使用した。

(2) 人工胆汁液耐性試験

胆汁末 (oxgall: Difco Laboratories 製) を 0.1, 0.2 または 0.3% 含む MRS 培地 (人工胆汁液) に *L. gasseri* および *L. casei* を 18 時間培養した MRS 前培養液を 1% (v/v) 接種した。嫌気条件、37℃ で 18 時間培養した後、濁度 (OD₆₆₀) を測定した。

3. 腸内有害菌との混合培養試験

(1) 培養条件および生菌数の測定

L. gasseri, *L. casei*, *C. perfringens* および *E. coli* を各々 12% 還元脱脂乳-0.1% 酵母エキス培地に接種し、嫌気条件下、37℃ で 18 時間培養した。培養後、*C. perfringens* または *E. coli* を *L. gasseri*, *L. casei* および *L. gasseri*+*L. casei* と共に 5 log cfu/ml (10⁵ cfu/ml) の濃度で 10% 還元脱脂乳培地に接種し、嫌気条件下、37℃ で 8, 24 および 48 時間培養した。比較対照のため、*C. perfringens* または *E. coli* のみを 10% 還元脱脂乳培地に接種した対照区を設けた。*L. gasseri* の菌数測定には MRS 寒天培地を使用し、45℃ で 2 日間嫌気培養した。*L. casei* の菌数測定には MRS 寒天培地を用い、37℃ で 2 日間嫌気培養した。*L. casei* は MRS 寒天培地

上で正円状に隆起した白色平滑な大型集落を形成し、*L. gasseri* は隆起が低く表面が粗で灰白色の集落を形成するので容易に区別が可能である。*E. coli* 用選択培地としては DHL 寒天培地 (日水製薬(株)製) を使用し、37℃ で 18 時間好気培養した。*C. perfringens* 用選択培地としては卵黄添加 CW 寒天培地 (日水製薬(株)製) を用い、37℃ で 18 時間嫌気培養した。

(2) 培養液の pH および乳酸濃度の測定

培養液の pH は、pH メーター (F-15: (株)堀場製作所製) を用いて測定した。乳酸濃度の測定には、F-キット D-/L-乳酸 (ロシュ・ダイアグノスティック製) を使用した。

実験結果

1. 人工胃液耐性試験

L. gasseri NY0509 および *L. casei* NY1301 の人工胃液における生残性を Fig. 1 に示した。pH 3.0 に調整された人工胃液中では、両菌株とも 4 時間後においても生菌数に変化はみられなかった。一方、pH 2.5 に調整した人工胃液中では、*L. casei* は、1 時間後には培養開始時の 1/1000 以下に減少した。*L. gasseri* は、経時的に減少し 3 時間後に培養開始時の約 1/50、4 時間後に約 1/1000 となった。

Fig. 1 Survival of *Lactobacillus gasseri* NY0509 and *Lactobacillus casei* NY1301 at pH 3.0 and pH 2.5 in MRS broth containing 0.04% pepsin

—○—, *L. gasseri* NY0509 in pH 3.0; —●—, *L. gasseri* NY0509 in pH 2.5; —△—, *L. casei* NY1301 in pH 3.0; —▲—, *L. casei* NY1301 in pH 2.5. Each value represents the mean $\pm$ SD of triplicate determinations.

Table 1 Effect of oxgall on OD₆₆₀ of *Lactobacillus gasseri* NY0509 and *Lactobacillus casei* NY1301 in MRS broth

Strain	OD ₆₆₀ (% of control)			
	% of oxgall	0.1	0.2	0.3
<i>L. gasseri</i> NY0509		132	11	4
<i>L. casei</i> NY1301		81	32	38

OD₆₆₀ values in control of *L. gasseri* NY0509 and *L. casei* NY1301 were 5.4 and 5.2, respectively.

2. 人工胆汁液耐性試験

L. gasseri NY0509 および *L. casei* NY1301 の人工胆汁液における生残性を Table 1 に示した。各菌株の胆汁末不含 MRS 培地における OD₆₆₀ 値に対する比により、各胆汁末濃度における生残性を表した。

L. gasseri は、0.1% 胆汁末を含む人工胆汁液では OD₆₆₀ 値の減少はみられず、逆に胆汁末不含対照に比べ OD₆₆₀ 値は 32% 増加した。しかし、それ以上の濃度では濃度依存的に OD₆₆₀ 値は大きく減少し、0.3% 胆汁末を含む人工胆汁液では、胆汁末不含対照に比べ OD₆₆₀ 値は 4% となった。一方、*L. casei* の OD₆₆₀ 値も人工胆汁液中では胆汁末不含対照に比べ減少したが、*L. gasseri* に比べ減少の程度は少なく、0.3% 胆汁末を含む人工胆汁液では OD₆₆₀ 値は胆汁末不含対照に対し 38% となった。

3. *E. coli* との混合培養試験

L. gasseri NY0509, *L. casei* NY1301 および *E. coli*

JCM 1649^T を混合培養したときの生菌数の経時的変化を Fig. 2 に示した。

L. gasseri の生菌数は培養 24 時間後に約 8.2 log cfu/ml で最大となったが、*E. coli*+*L. gasseri* における 48 時間後の *L. gasseri* の生菌数は、24 時間後と比較して約 1/10 に減少した (Fig. 2 (a))。

一方、*L. casei* は *E. coli*+*L. casei* および *E. coli*+*L. gasseri*+*L. casei* の両混合培養において、培養 24 時間後に約 9.1 log cfu/ml でほぼ定常期に達した (Fig. 2 (b))。また、培養 48 時間後の *Lactobacillus* の総生菌数は、*E. coli*+*L. casei* と *E. coli*+*L. gasseri*+*L. casei* の間で差はみられなかった (前者: 9.35±0.04 log cfu/ml, 後者: 9.28±0.02 log cfu/ml)。

これに対し、*E. coli* は何れの培養系でも培養 8 時間後には 8.4~8.5 log cfu/ml でほぼ定常期に達し、24 時間後まで生菌数はほとんど変化しなかった。しかし、培養 48

Fig. 2 Growth of *Lactobacillus gasseri* NY0509 (a), *Lactobacillus casei* NY1301 (b) and *Escherichia coli* JCM 1649^T (c) in mixed-culture in milk

—○—, *E. coli* JCM 1649^T; —●—, *E. coli* JCM 1649^T+*L. gasseri* NY0509; —△—, *E. coli* JCM 1649^T+*L. casei* NY1301; —▲—, *E. coli* JCM 1649^T+*L. gasseri* NY0509+*L. casei* NY1301. Each value represents the mean±SD of triplicate determinations.

Fig. 3 Changes in pH (a) and lactic acid concentration (b) in mixed-culture of *Escherichia coli* JCM 1649^T with *Lactobacillus gasseri* NY0509 and/or *Lactobacillus casei* NY1301 in milk

—○—, *E. coli* JCM 1649^T; —●—, *E. coli* JCM 1649^T + *L. gasseri* NY0509; —△—, *E. coli* JCM 1649^T + *L. casei* NY1301; —▲—, *E. coli* JCM 1649^T + *L. gasseri* NY0509 + *L. casei* NY1301. Each value represents the mean $\pm$ SD of triplicate determinations.

時間後の混合培養系では、*E. coli* + *L. gasseri* > *E. coli* + *L. casei* > *E. coli* + *L. gasseri* + *L. casei* の順に減少した。特に、*E. coli* + *L. gasseri* + *L. casei* 培養系における *E. coli* の生菌数は、単独培養に比べ 10^5 倍以上減少した (Fig. 2 (c)).

L. gasseri NY0509, *L. casei* NY1301 および *E. coli* JCM 1649^T を混合培養したときの pH および乳酸濃度の経時的变化を Fig. 3 に示した。

培養液の pH は培養開始後何れの培養系でも低下していったが、*E. coli* 単独培養では、24 時間以後 pH 5.25 付近で安定した。これに対し、*L. gasseri* および *L. casei* が共存する培養系では、48 時間後まで経時的に培養液の pH は低下し続け、pH 低下の順位と *E. coli* の生菌数の順位は相似していた (Fig. 3 (a)).

培養液の乳酸濃度は培養液の pH と相関して経時的に増加し、各培養系の乳酸濃度は、*E. coli* < *E. coli* + *L. gasseri* < *E. coli* + *L. casei* < *E. coli* + *L. gasseri* + *L. casei* の順に高くなった (Fig. 3 (b)).

4. *C. perfringens* との混合培養試験

L. gasseri NY0509, *L. casei* NY1301 および *C. perfringens* JCM 1290^T を混合培養したときの生菌数の経時的变化を Fig. 4 に示した。

L. gasseri および *L. casei* の生菌数は、何れの混合培養系でも培養 24 時間後に各々約 $8.5 \log \text{cfu/ml}$ および約 $9.2 \log \text{cfu/ml}$ でほぼ定常期となり、48 時間後も減少しなかった (Fig. 4 (a), (b)). また、培養 48 時間後の

Lactobacillus の総生菌数は、*C. perfringens* + *L. casei* と *C. perfringens* + *L. gasseri* + *L. casei* の間で差はみられなかった (前者: $9.28 \pm 0.04 \log \text{cfu/ml}$, 後者: $9.34 \pm 0.04 \log \text{cfu/ml}$).

一方、*C. perfringens* の生菌数は、*C. perfringens* + *L. gasseri* + *L. casei* を除いたすべての培養系で 24 時間後まで対数的に増加した。これに対し、*C. perfringens* + *L. gasseri* + *L. casei* では培養 8 時間後に培養開始時に比べ生菌数は減少し、24 時間後も *C. perfringens* 単独培養に比べ生菌数は若干抑制されていた。培養 48 時間後の *C. perfringens* の生菌数は、単独培養では $8.01 \pm 0.15 \log \text{cfu/ml}$ で 24 時間後とはほぼ同程度であったのに対し、混合培養系では *C. perfringens* + *L. gasseri* > *C. perfringens* + *L. casei* > *C. perfringens* + *L. gasseri* + *L. casei* の順に *C. perfringens* の生菌数は減少した。特に、*C. perfringens* + *L. gasseri* + *L. casei* 培養系における *C. perfringens* の生菌数は単独培養に比べ 10^5 倍以上減少した (Fig. 4 (c)).

L. gasseri NY0509, *L. casei* NY1301 および *C. perfringens* JCM 1290^T を混合培養したときの pH および乳酸濃度の経時的变化を Fig. 5 に示した。

培養液の pH は培養開始後何れの培養系でも低下していったが、*C. perfringens* 単独培養では、24 時間以後 pH 5.30 付近で安定した。これに対し、*L. gasseri* および *L. casei* が共存する培養系では、48 時間後まで経時的に培養液の pH は低下し続け、pH 低下の順位と *C.*

Fig. 4 Growth of *Lactobacillus gasseri* NY0509 (a), *Lactobacillus casei* NY1301 (b) and *Clostridium perfringens* JCM 1290^T (c) in mixed-culture in milk

—○—, *C. perfringens* JCM 1290^T; —●—, *C. perfringens* JCM 1290^T+*L. gasseri* NY0509; —△—, *C. perfringens* JCM 1290^T+*L. casei* NY1301; —▲—, *C. perfringens* JCM 1290^T+*L. gasseri* NY0509+*L. casei* NY1301. Each value represents the mean±SD of triplicate determinations.

Fig. 5 Changes in pH (a) and lactic acid concentration (b) in mixed-culture of *Clostridium perfringens* JCM 1290^T with *Lactobacillus gasseri* NY0509 and/or *Lactobacillus casei* NY1301 in milk

—○—, *C. perfringens* JCM 1290^T; —●—, *C. perfringens* JCM 1290^T+*L. gasseri* NY0509; —△—, *C. perfringens* JCM 1290^T+*L. casei* NY1301; —▲—, *C. perfringens* JCM 1290^T+*L. gasseri* NY0509+*L. casei* NY1301. Each value represents the mean±SD of triplicate determinations.

perfringens の生菌数の順列は相似していた (Fig. 5 (a)). 培養液の乳酸濃度は培養液の pH と相関して経時的に増加し、各培養系の乳酸濃度は、*C. perfringens* < *C. perfringens*+*L. gasseri* < *C. perfringens*+*L. casei* < *C. perfringens*+*L. gasseri*+*L. casei* の順に高くなった (Fig. 5 (b)).

考 察

FULLER⁵⁾ により「宿主の腸内菌叢のバランスを改善することにより、宿主に有益な作用をもたらすような、経口摂取する生きた微生物」と提唱されたプロバイオティクスの定義は、最近さらに拡大され、「生きた細胞と死んだ細胞、あるいはその一方とその代謝物を含んだ微生物

製剤で、消化管粘膜表面に生息する微生物の酵素活性を改善し、また免疫機能を刺激する目的を持つもの」とされている⁸⁾。しかし、プロバイオティクスの作用機序としては、その増殖による量的な競合によって *C. perfringens* などの有害菌を排除することや、産生した有機酸や抗菌物質により有害菌の増殖代謝を抑制することによるものが大きい⁵⁾⁹⁾。それ故、プロバイオティクス菌は、生きて胃を通過し、腸管に到達する方が有利であると考えられる。

乳酸菌飲料を含む発酵乳中の乳酸菌がプロバイオティクスとして機能する条件として、(1)ヒトに対して安全であること、(2)プロバイオティクスの効果を発現するのに十分な菌数が発酵乳製品中で存在すること、(3)摂取後、胃内の酸性条件や腸管内の胆汁存在下で生残すること、(4)到達した腸管内で増殖すること、などが挙げられる⁵⁾。これらの条件の中で特に重要なことは、殺菌力の強い胃酸や胆汁を含む消化液耐性があることと考えられる。

空腹時のヒト胃内は、胃酸によって pH 1~2 に保たれ、殺菌作用が強い状態にある¹⁰⁾。しかし、空腹時に牛乳 180 ml を摂取すると胃内の pH は 3~4 に上昇し¹¹⁾、さらに、肉や野菜などの通常の食事を摂取すると pH は 4~5 に上昇するとされている¹²⁾。そのため、本研究では pH 3.0 を基本として人工胃液耐性試験を行った。また、通常胃内消化物が完全に十二指腸に移送されるのに約 2 時間かかる¹³⁾ことから、処理時間は 4 時間までとした。その結果、*L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 は、pH 3.0 の条件下では両菌株とも培養 4 時間後まで生菌数の減少はみられず、高い生残性を示した。しかし、pH 2.5 では両菌株とも生菌数は減少した。しかし、*L. casei* NY1301 は 1 時間後に 0.1% 以下に減少したのに対し、*L. gasseri* NY0509 は 3 時間後においても 2% が生存しており、比較的高い人工胃液耐性を示した。

腸管内の胆汁は、摂取した食物の種類により分泌量が異なり、また、消化管の部位によりその濃度に差があることから腸管内の胆汁濃度を一定値として求めることは困難と考えられるが、DAVENPORT は、腸管内の胆汁濃度は最高値で 2% と報告している¹⁴⁾。胆汁濃度 2% は、胆汁末濃度 0.2% に相当することから、本研究における人工胆汁液耐性試験では、胆汁末濃度 0.2% を基本とし、その半量の 0.1% および 1.5 倍の 0.3% を設定した。その結果、両菌株において、胆汁末濃度に依存した菌濁度 (OD₆₀₀) の抑制がみられた。しかし、本試験では、定常期前期 (培養 18 時間後) の MRS 前培養液を 1% 接種して培養を開始したことを考え合わせると、*L. casei*

NY1301 は 0.3% 胆汁末存在下でも比較的高い増殖性を示し、胆汁耐性が高いことが推察される。一方、*L. gasseri* NY0509 の菌濁度は胆汁末不含対照に比し 0.2% 胆汁末存在下で 11%、0.3% 胆汁末存在下で 4% でしかなかったが、上記のように接種菌数から考えると、本菌株は 0.3% 胆汁末存在下でも生存することが示唆される。以上の結果より、*L. casei* NY1301 は人工胆汁液耐性に優れ、*L. gasseri* NY0509 も人工胆汁液耐性を示すことが示唆された。

既報において、著者らは、上記の *Lactobacillus* 2 菌株により発酵調製した乳酸菌飲料を摂取したヒトの糞便中で *L. gasseri* が増加し、*L. casei* が摂取時に検出されたことから、これらの菌株が生菌で腸管まで到達した可能性を示した⁶⁾。*L. gasseri* NY 0509 および *L. casei* NY1301 に人工消化液耐性が認められた本研究結果は、上記の仮説を強く支持するものと考えられる。

一般的に、発酵乳摂取によりヒト腸管内で増加した乳酸菌やビフィズス菌が乳酸や酢酸などの有機酸を産生し、腸管内の環境を酸性化することにより有害菌を抑制すると考えられている¹⁴⁾。*L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 が乳酸菌飲料の形態でヒトに摂取され、腸内に到達すると、同時に到達した発酵乳中の乳成分などを栄養源として、腸管内先住の有害菌と競合状態になると考えられる。摂取後、乳酸菌飲料中の *L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 は各々 6 log cfu/ml 以上および 8 log cfu/ml 以上含まれていた⁶⁾⁷⁾が、人工消化液耐性試験で認めたように、胃液や腸液の殺菌および希釈作用により、腸管内に到達するまでに大きく低下することが予想されることを想定し、本実験では、これら *Lactobacillus* 菌株の接種菌数を 5 log cfu/ml に設定した。

供試 *Lactobacillus* 2 菌株は、*E. coli* JCM 1649^T および *C. perfringens* JCM 1290^T の培養 24 時間後までの増殖に対し明らかな抑制作用を示さなかったが、48 時間後には両菌株の生菌数を減少させ、その抑制作用は *Lactobacillus* 両菌株を混合した場合が最も強く、*L. casei* NY1301 がそれに次ぎ、*L. gasseri* NY0509 はこれら 3 種類の混合培養系で一番抑制作用が弱かった。そして、*E. coli* および *C. perfringens* の生菌数の減少の程度は、培養液の pH の低下および培養液の乳酸濃度の増加の程度と相関していた。以上の結果から、*L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 が産生した乳酸が培養液の pH を低下させ、*E. coli* および *C. perfringens* を減少させた可能性が考えられた。本研究における *L. gasseri*

NY0509 の *E. coli* および *C. perfringens* に対する抑制作用が *L. casei* NY1301 と比較して弱かった理由として、10% 還元脱脂乳中での *L. gasseri* NY0509 の増殖が *L. casei* NY1301 に劣り、定常期の生菌数が約 1/10 にしか達せず、そのため、本菌株による乳酸の産生が *L. casei* NY1301 に比べ少なかったことによると考えられる。一方、*E. coli* および *C. perfringens* の両培養系に *Lactobacillus* 2 菌株を同時に混合培養した場合、培養 48 時間後の両菌株を合わせた総 *Lactobacillus* 数は、何れも *L. casei* NY1301 のみを混合培養した場合と同程度であったが、培養液の乳酸濃度は両菌株を混合した方が高い傾向にあった。これらの成績は、*L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 が各々単菌株で存在する場合よりも両菌株が共存した場合の方が乳酸濃度が高く、pH が低くなるので、相加・相乗的に腸内有害菌を抑制する可能性を示唆している。これに対し、これらの *L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 が *E. coli* および *C. perfringens* の増殖を明確に抑制できなかったのは、培養 24 時間以前では両 *Lactobacillus* 菌株の菌数が少なく乳酸発酵量が *E. coli* および *C. perfringens* の増殖を抑制するのに必要な量に達していなかったことが考えられる。実際、瀧口らは、*L. acidophilus* SBT2062 および *Bifidobacterium longum* SBT2928 を *E. coli* および *C. perfringens* と混合培養したとき、*L. acidophilus* SBT2062 および *B. longum* SBT2928 の接種菌数が多いほど *E. coli* および *C. perfringens* の生育が強く抑制されることを報告している¹⁵⁾。従って、*L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 がヒト腸管内に到達した後、有害菌抑制作用を発揮するためには両菌株が腸管内部に定着、ある程度増殖し、乳酸などの有機酸を産生する必要があると考えられる。

一方、*L. gasseri* NY0509 の培養 48 時間後の生菌数は、*C. perfringens* との混合培養や *L. casei* NY1301 の共存下ではみられなかったが、*E. coli* と混合培養した場合のみ、24 時間後に比べ約 1/10 に減少した。この原因については、現段階では不明である。

以上の成績より、乳酸菌飲料の形態で摂取された *L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 は、生菌の状態で腸管内に到達し、そこで乳酸菌飲料に含まれる乳成分などを栄養源として増殖、代謝することにより、相加・相乗的に腸内有害菌を抑制する可能性が示された。以前、著者らはこれらの *Lactobacillus* 菌株により発酵調製した乳酸菌飲料を摂取した健康成人において、糞便中 *C. perfringens* の検出率の低下を観察した⁶⁾ が、本研究

結果は、既報の結果を裏付けるものと考えられる。

要 約

L. gasseri NY0509 および *L. casei* NY1301 の *in vitro* における人工消化液（人工胃液および人工胆汁液）耐性および腸内有害細菌（*E. coli* および *C. perfringens*）の生育に対する抑制効果を検討した。

(1) *L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 は、両菌株とも 0.04% ペプシンを含む pH 3.0 の人工胃液中で、4 時間後まで高い生残性を示した。また、0.3% 胆汁末を含む人工胆汁液中で、*L. casei* NY1301 は比較的高い増殖性を示した。一方、*L. gasseri* NY0509 の増殖は抑制されたものの、胆汁耐性を示した。

(2) 腸内有害菌との混合培養試験において供試 *Lactobacillus* 2 菌株は、*E. coli* JCM 1649^T の増殖に対し抑制作用を示さなかったが、これらの 2 菌株が定常期に入った 48 時間後では、(a) *L. gasseri*, (b) *L. casei*, (c) *L. gasseri* + *L. casei* は何れも *E. coli* の菌数を明確に減少させ、その作用は (c) が最も強く、これら *Lactobacillus* の乳酸産生量に依存していた。*C. perfringens* JCM 1290^T の増殖に対しては、(c) *L. gasseri* + *L. casei* のみ若干の抑制作用を示した。さらに、*L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 が定常期に入った 48 時間後では、(a) *L. gasseri*, (b) *L. casei*, (c) *L. gasseri* + *L. casei* の何れも *C. perfringens* の菌数を明らかに減少させ、その作用は乳酸濃度産生量が最も多かった (c) が最も強かった。

本研究を実施するに当たり、*L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 を分与下さいました日清ヨーク（株）開発研究所に深謝いたします。

文 献

- 1) 光岡知足：食衛誌，36，583 (1995)。
- 2) 細田正孝・何方・平松 優・橋本英夫・辨野義己：ピフィズ，8，21 (1994)。
- 3) SPANHAAR, S., HAVENAAR, R. and SCHAAFSMA, G.: *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52, 899 (1998)。
- 4) LINK-AMSTER, H., ROCHAT, F., SAUDAN, K.Y., MIGNOT, O. and AESCHLIMANN, J. M.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 10, 55 (1994)。
- 5) FULLER, R.: *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365 (1989)。
- 6) 東 幸雅・伊藤和徳・大木篤史・井上明浩・井上和久・佐藤 学・辨野義己：食科工，48，35 (2001)。
- 7) 東 幸雅・伊藤和徳・大木篤史・上田和彦・井上

- 和久・佐藤 学・辨野義己：健康・栄養食品研究, **3**, 63 (2000).
- 8) REUTER, G. : Present and future of probiotics in Germany. (学会出版センター, 東京), p. 19 (1998).
- 9) OUWEHAND, A.C. and SALMINEN, J.J. : *Int. Dairy J.*, **8**, 749 (1998).
- 10) 武藤泰敏：新版 消化・吸収 (第一出版, 東京), p. 137 (1988).
- 11) 細田四郎：胃腸病, 新病態栄養学双書 第2巻 (第一出版, 東京), p. 35 (1984).
- 12) 武藤泰敏：新版 消化・吸収 (第一出版, 東京), p. 129 (1988).
- 13) 武藤泰敏：新版 消化・吸収 (第一出版, 東京), p. 131 (1988).
- 14) 湧口浩也・工藤 力・小此木成夫：発酵乳類の機能—健康科学の探索—, 中澤勇二・細野明義編 ((株)食品資材研究会), P. 185 (1988).
- 15) 瀧口隆一・望月英輔・鈴木 豊・中島一郎・辨野義己：腸内細菌学雑誌, **11**, 11 (1997).
- (平成 13 年 3 月 16 日受付, 平成 13 年 6 月 7 日受理)
-