

## ミルクオリゴ糖のビフィズス菌に対する増殖促進活性

川名 広子\*, 有田 政信\*

(平成12年10月5日受理)

### Growth-promoting activity of milk oligosaccharides on *Bifidobacterium*

Hiroko KAWANA and Masanobu ARITA

(Received on October 5, 2000)

キーワード：増殖促進活性, ミルクオリゴ糖, ビフィズス菌, シアル化オリゴ糖, 泌乳期

Key words : growth-promoting activity, milk oligosaccharide, *Bifidobacterium*, sialylated oligosaccharide, lactation

#### 緒言

母乳栄養児は、人工栄養児と比べて、消化器疾患、細菌やウイルスによる感染症に罹患しにくく、又罹患した場合でも死亡率が低いと報告されている<sup>1)~3)</sup>。この理由として、母乳は免疫グロブリン、リゾチーム、ラクトフェリンなど種々の感染防御物質を含有していることが考えられる<sup>4)</sup>。腸内細菌叢は、共生、拮抗関係を維持しながら、摂取した食物や消化管から分泌された生体成分を栄養素として増殖、排泄を繰り返す、宿主の健康維持、疾病回復と密接に関与していることが明らかとなっている。

胎児は、母胎内において完全な無菌状態に置かれているが、誕生と同時に、皮膚、気道、消化管などの粘膜で細菌が感染し増殖する。そして、出生後1日目の糞便中には *E.coli*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* などの微生物が検出され、3日目に *Bifidobacterium* が出現し、1週間のうちに *Bifidobacterium* が最優勢菌となる。腸内細菌叢のバランスが安定化するのには、生後10~20日である。この後、幼児期の腸内細菌叢の形成は、離乳などの食変化に伴って成人期の腸内細菌叢を形成するといわれている<sup>5)</sup>。

1899年、フランスの Tissier が母乳栄養児の糞便中より、グラム陽性、無芽胞形成、桿菌(多形成)であるビフィズス菌を発見した<sup>6)</sup>。Haenel らは母乳栄養児の糞便中の pH は  $5.05 \pm 0.28$  であるのに対して、混合栄養児で

は  $pH 5.68 \pm 0.78$  そして人工栄養児では  $pH 6.95 \pm 0.68$  であると報告している<sup>7)</sup>。つまり、母乳栄養児の糞便は、人工栄養児の糞便より pH が低く、*Bifidobacterium* を高い割合で有している。故に、ヒトミルク中の特異的な成分が、乳幼児の腸内細菌叢の形成に強く関与していると考えられた。

ヒト、動物の腸内微生物で最も優勢である *Bifidobacterium* は、有機酸を産生して腸内を酸性にし、宿主にとって有害な代謝物を抑制する。ビフィズス菌は、動物以外にもミツバチの腸管からも検出されている。ヒト腸管内に棲息するビフィズス菌の数や種類は、一生の間に変化し、乳幼児期、学童期、成年期、老年期の4期に分けることができる。これらの4期に棲息するビフィズス菌の特徴は、乳幼児期は *B.infantis* と *B.breve* が主体で、加齢と共に *B.adolescentis* が主体となり、*B.longum*, *B.bifidum* は生涯を通じて存在することである。

György らは、1971年、ヒトミルク中に *B.bifidum* の増殖因子が存在することを発見した<sup>8)</sup>。後にこれらは N-アセチルグルコサミンを含有する糖タンパク質、オリゴ糖であることが判明した。

ミルクオリゴ糖には、第一次機能の栄養、第二次機能の味や物理学的特異性の面から重用視されてきたが、近年第三次機能の生体調節機能が注目されている。日本を初めとする各国で、異性化、酵素合成、分離精製、酸縮合、酵素分解法等によりラクチュロース、乳果オリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖、ラフィノース、パラチノース、キシ

\* 栄養学科 食品学第2研究室

ロオリゴ糖などが合成され、ビフィズス菌増殖効果を有するオリゴ糖として、ヨーグルト、健康食品、シロップなどに添加されている<sup>9)</sup>。

ビフィズス菌により資化される単糖は、フコース、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、グルコースであると考えられているが、ヒト乳中の酸性オリゴ糖であるシアル酸については未だ明らかとされていない。そこでシアル酸含有オリゴ糖がビフィズス菌にどのような影響を与えるかについて基礎研究を行った。本研究では、ヒト、ウシ生乳及びウシ加工乳より得た粗糖質画分、中性糖質画分、酸性糖質画分のビフィズス菌 11 菌株に対する増殖促進活性について検討した。

## 実験材料及び方法

### 1. 実験材料

*B.infantis* S12, *B.infantis* 15075 I-10-5, *B.breve* a S1, *B.breve* b S46, *B.bifidum* a E319, *B.bifidum* b S28a, *B.bifidum* IFO14252, *B.longum* a E194b, *B.longum* Kd-5-6, *B.adolescentis* a E194a, *B.adolescentis* c E298b の 11 菌株を用いた。*B.bifidum* IFO14252 は、(財)発酵研究所より購入し、その他の菌株は森永乳業(株)より供与された。これらの菌株の培養は、GAM ブイヨン「ニッスイ」培地(日水製菓(株))を用いた。

ヒト乳試料(出産後 6 日目~108 日目)は血液型 A 型の健康な母親(28 歳, 初産)より、ウシ乳試料(出産後 2 日目, 20 日目)は森永乳業(株)より供与された。また、ウシ加工乳は森永乳業(株)を用いた。糖標準として用いた Glucose は関東化学(株)、Lactose, Glucosamine は SIGMACHEMICAL CO. から購入した。Gal-Lac は日新製糖(株)より供与された。

### 2. 乳中の粗糖質画分の抽出および中性糖質、酸性糖質の分画方法

粗糖質画分の抽出は、ヒト、ウシ乳および加工乳から Folch の分配法に従って行った<sup>10)</sup>。粗糖質画分の分画は、蒸留水で平衡化した DEAE-CELLULOSE A-200-m カラムを用いて蒸留水、1300mM ピリジン酢酸緩衝液(pH5.0)で溶出し、中性糖質画分、酸性糖質画分として凍結乾燥した。ヒト乳から得た粗糖質画分、中性糖質画分、酸性糖質画分(5mg/250 $\mu$ l)を、前報<sup>11)~13)</sup>に従って薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開し、全糖及びシアル酸の発色後、2 波長デンシトメータによる解

析を行った。又各画分は、水で溶解し MILLIPORE MILLEX-HV13 により濾過滅菌を行い、ビフィズス菌増殖促進活性を検討する試料とした。

### 3. ビフィズス菌の培養方法

1%Glc 添加 GAM 培地を 10ml ネジ口試験管に 5ml ずつ分注、滅菌後、各ビフィズス菌株を接種し、嫌気条件下(Gas Pak 装置)で、37°C 恒温器(HITACHI)内で培養を行った。24~48 時間培養後、懸濁して均一にした後、新しい培地入り試験管へ 100 $\mu$ l 接種し、同様の条件で(Gas-Pak)培養した。この操作を繰り返して継代培養を行った。

### 4. ビフィズス菌増殖促進試験の方法

ヒト乳(出産後 6, 7, 8, 10, 11, 15, 18, 28, 45, 50, 108 日目)から得た粗糖質画分、中性糖質画分、酸性糖質画分、ウシ乳(出産後 2, 20 日目)と加工乳から得た粗糖質画分及び Glucose, Lactose, Gal-Lac, Glucosamine を試料とした。1%Glc 添加 GAM 培地で前述の方法によって継代培養、前培養したビフィズス菌を接種し、各糖試料 4 mg/培地 5 ml あるいは 100 $\mu$ g/培地 5 ml となるよう 2 連ずつ試験管に添加、ミキサーで攪拌した。対照として、糖無添加についても 48 時間、37°C、嫌気条件下(Gas-Pak 内)の保温器内で培養を行った。培養後、各培地を 5°C、3000 rpm、15 分遠心分離を行い、上澄液を 3.5 ml、採取し、蒸留水 35 ml、1%フェノールフタレインを添加して 0.05N-NaOH で酸度測定を行った。増殖促進活性は、コントロール培地の酸度に対する供試試料添加培地の酸度の比率から求めた。ビフィズス菌増殖促進活性の計算方法を以下に示した。

$$\text{増殖促進活性度} = \frac{\text{各試料添加培地の滴定値}}{\text{試料無添加培地の滴定値}}$$

## 結果

### 1. 乳中糖質画分の成分組成

ヒト乳中粗糖質量は、約 6.3% で全泌乳期においてほぼ一定値を維持した。粗糖質のうち、中性糖は約 80% (Data not shown) で、泌乳期を経るに従い僅かに減少した。一方、酸性糖質の含有比は、出産後 6 日目に最高値の約 7%、その後泌乳期を経るごとに徐々に減少し、11 日目には 4.2%、28 日目には 2.1%、50 日目には 0.6% を示した。全酸性糖質のうち、モノシアルオリゴ糖が約 60~70%、ジシアルオリゴ糖が約 20~30% を示した。酸性糖画分の泌乳期変動について検討したところ、

モノシアロ画分は10日目以降に50%以下まで急激に減少し、その後徐々に減少した。一方、ジシアロ画分は泌乳期の経過とともに緩やかに減少した。

ヒト乳より得た粗糖質画分、中性糖質画分、酸性糖質画分をTLCにより全糖及びシアル酸の検出を行った。オルシノール硫酸試薬により全糖の検出した結果をFig. 1に示した。全泌乳期を通して粗糖質画分、中性糖

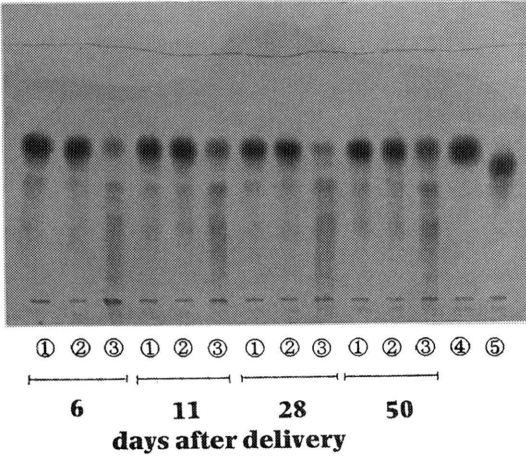


Fig. 1 Thin layer chromatogram of oligosaccharides from human milk duration of lactation

- ① crude oligosaccharides fraction
- ② neutral oligosaccharides fraction
- ③ acidic oligosaccharides fraction
- ④ Lac
- ⑤ Gal-Lac

質画分は、Lacが主成分となっており、酸性糖質画分は、6'-SL画分が主要成分であった。6'-SLは30日目以降から約50%程度に大きく減少し、3'-SLは泌乳期による変動が認められなかった。多種のシアル化オリゴ糖の総量は6'-SLと同様に30日目ごろから50%以下に激減した。但し、同量の糖を溶解してTLC分析を行ったときは、組成の大きな変化は認められなかった。

## 2. ヒト及びウシ乳から得た粗糖質画分によるビフィズス菌の増殖促進活性

最初に、ヒト乳(6, 7, 8, 10, 11, 15, 18, 28, 45, 50, 108日目)、ウシ乳(2, 20日目)、加工乳から得た粗糖質画分及び糖標準のGlc, Lac, Gal-Lac, Glucosamineを用いて、ヒトの一生を通じて腸管内に存在する*B. bifidum* (IFO14252)の増殖促進活性について検討した。*B. bifidum*を接種した培地に各供試試料を0.8 mg/1 mlとなるように添加し、48時間、37°C, Gas

Pak装置内で嫌氣的に培養した。その後、酸度測定を行い、増殖促進活性度を算出しその結果をFig. 2に示した。増殖促進活性は、強弱の差異はあるもののヒト乳6日目~108日目の全粗糖質画分とGal-Lacにおいて認められた。泌乳期と増殖促進活性の強さの関係について注目すると、ヒト乳6日目で最大活性を示しその後減少し

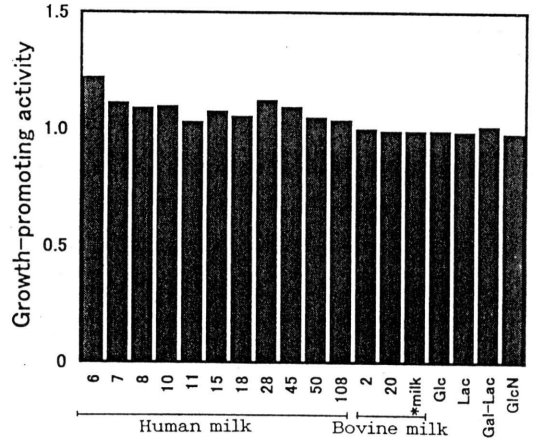


Fig. 2 Growth-promoting activity of crude oligosaccharides fraction on *B. bifidum* IFO14252 (\*milk) processed milk

11日目以降から再び増加し、30日目から徐々に減少するという特異的なパターンを示した。一方、ウシ初乳及び常乳、加工乳から得た画分によるビフィズス菌の増殖促進活性は、全く認められなかった。また、標準として用いたLactose, Glucose, Glucosamineにもほとんど増殖促進活性は認められなかった。

これらの結果から、増殖促進活性が確認されたヒト乳の6, 11, 28, 50, 108日目から得た糖質画分の*B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* 11菌株に対する増殖促進活性について詳細に検討を行った。

## 3. ヒト乳から得た中性、酸性糖質画分によるビフィズス菌11菌株の増殖促進活性

ヒト腸管内に存在する5種のビフィズス菌、*B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*の11菌株について増殖促進活性の検討を行った。試料はヒト乳(6, 11, 28, 50, 108日目)から得た粗糖質画分、中性糖質画分、酸性糖質画分及び標準糖のLac, Gal-Lacを用いた。供試試料をビフィズス菌添加培地に20 µg/1 mlとなるように添加し、48時間、37°C, Gas Pak装置内で嫌氣的条件下で培養を行った。酸度の測定を行いビフィズス菌増殖促進活性を算出

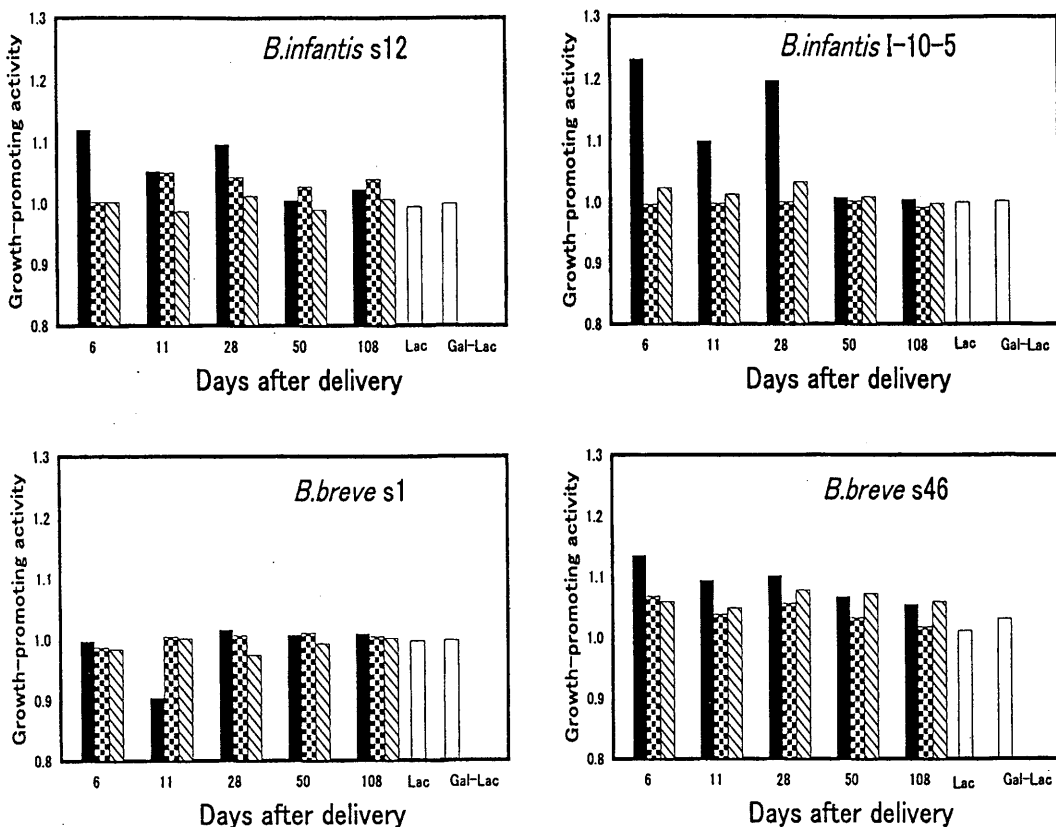


Fig. 3-1 Growth-promoting activity of extracted and partitioned oligosaccharides fraction from human milk on *B. infantis* and *B. breve*  
 (■) crude oligosaccharides fraction  
 (▨) neutral oligosaccharides fraction  
 (▧) acidic oligosaccharides fraction

し Fig. 3-1, 3-2, 3-3 に示した。

各糖質画分のいずれかの画分で増殖促進活性が認められた菌株は、*B. infantis* (S12・15075 I-10-5), *B. breve* (b S46), *B. bifidum* (IFO14252), *B. longum* (a E194b, Kd-5-6), *B. adolescentis* (aE194a, c E298b) であり、増殖促進活性度 1.24 の最高値を示す菌株は、*B. infantis* (15075 I-10-5) であった。*B. breve* (a S1), *B. bifidum* (a E319, b S28a) は、いずれの画分でも活性が認められなかった。*B. longum* は、a E194b より Kd-5-6 の方が、*B. adolescentis* は、a E194a より c E298b の方が増殖促進活性が高かった。

粗糖質画分による、*B. infantis* (S12, 15075 I-10-5), *B. breve* (b S46), *B. longum* (a E194b, Kd-5-6),

*B. adolescentis* (a E194a, c E298b) のピフィズ菌増殖促進活性は、2 の結果と類似していた。6 日目の粗糖質画分で最高値の増殖促進活性が認められ、11 日目には増殖促進活性が低下し、28 日目には再び活性が増大し、50 日目以降では明らかに減少して僅かに認められる程度となった。増殖促進活性が強く認められた菌株について、中性糖、酸性糖画分の活性に一定の傾向は認められなかった。*B. infantis* (15075 I-10-5), *B. breve* (b S46), *B. bifidum* (IFO14252) は、酸性糖質画分において増殖促進活性が認められた。

標準として用いた Lactose や Gal-Lac では弱い増殖促進活性が認められた。

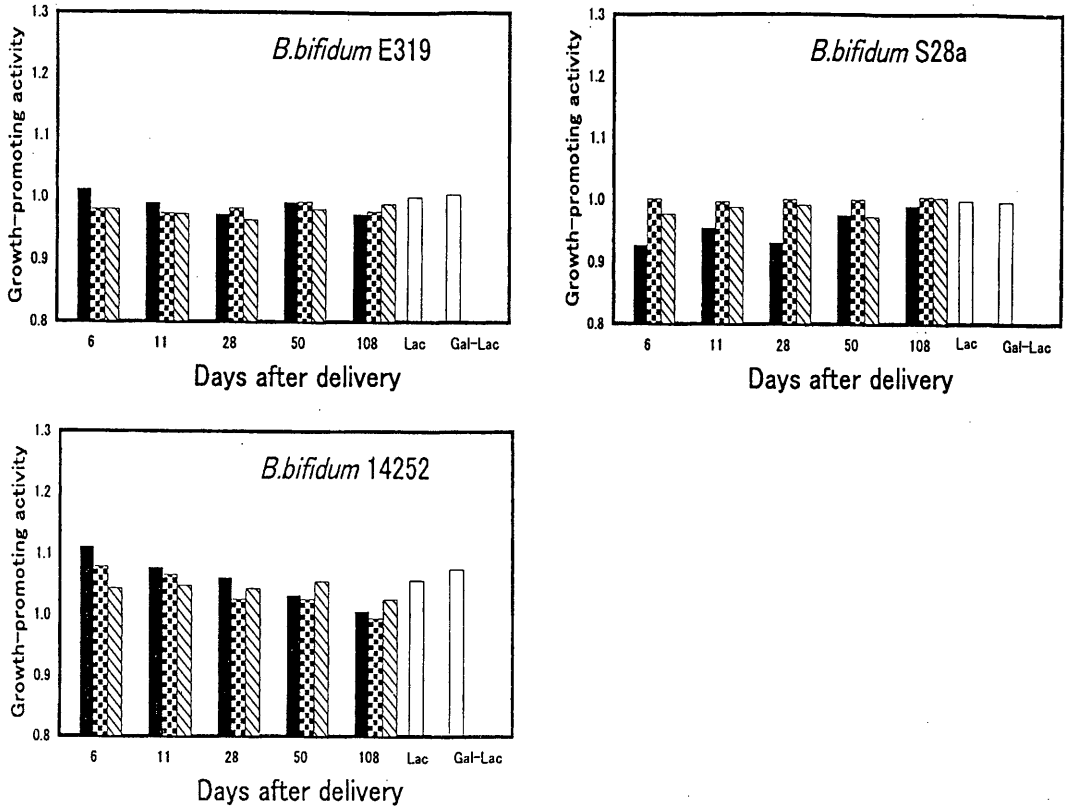


Fig. 3-2 Growth-promoting activity of extracted and partitioned oligosaccharides fraction from human milk on *B. bifidum*

- (■) crude oligosaccharides fraction
- (▨) neutral oligosaccharides fraction
- (▧) acidic oligosaccharides fraction

### 考 察

中性、酸性合わせて約130種類のミルクオリゴ糖が同定されている。<sup>2),3),14),15)</sup>いくつかの中性オリゴ糖はビフィズス菌の増殖促進活性が報告<sup>16)~18)</sup>されているが、酸性オリゴ糖のそれについては検討されていない。そこで、酸性オリゴ糖の主要成分であるシアル酸含有オリゴ糖によるビフィズス菌の増殖促進活性について基礎検討を行った。

最初に出産後6日目~108日目のヒト乳より粗糖質画分を得、乳幼児から成人期に至るまで腸内に存在する *B. bifidum* (IFO14252) への増殖促進活性を検討した。粗糖質画分4 mg/培地5 ml 添加した時、供試試料のすべ

てにおいて強弱の差異はあるがビフィズス菌の増殖促進活性が認められた。そして泌乳期による増殖促進活性の変動に一定の傾向が認められた。増殖促進活性は出産後6日目のミルクから得た粗糖質画分を供試した時に最大値を示した後、減少し、11日目に低値を示した。その後、再度活性が高くなり28日目以降、泌乳期を経るごとに徐々に活性は低下した。

*B. bifidum* (IFO14252) の増殖促進活性が確認されたヒト乳に注目し、粗糖質画分及びそれをイオン交換カラムクロマトグラフィーによって分画した中性オリゴ糖画分、酸性オリゴ糖画分を供試試料とし、100 μg/培地5 ml 添加した。乳幼児期、成人期、老年期のヒト腸管内に棲息する *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*,

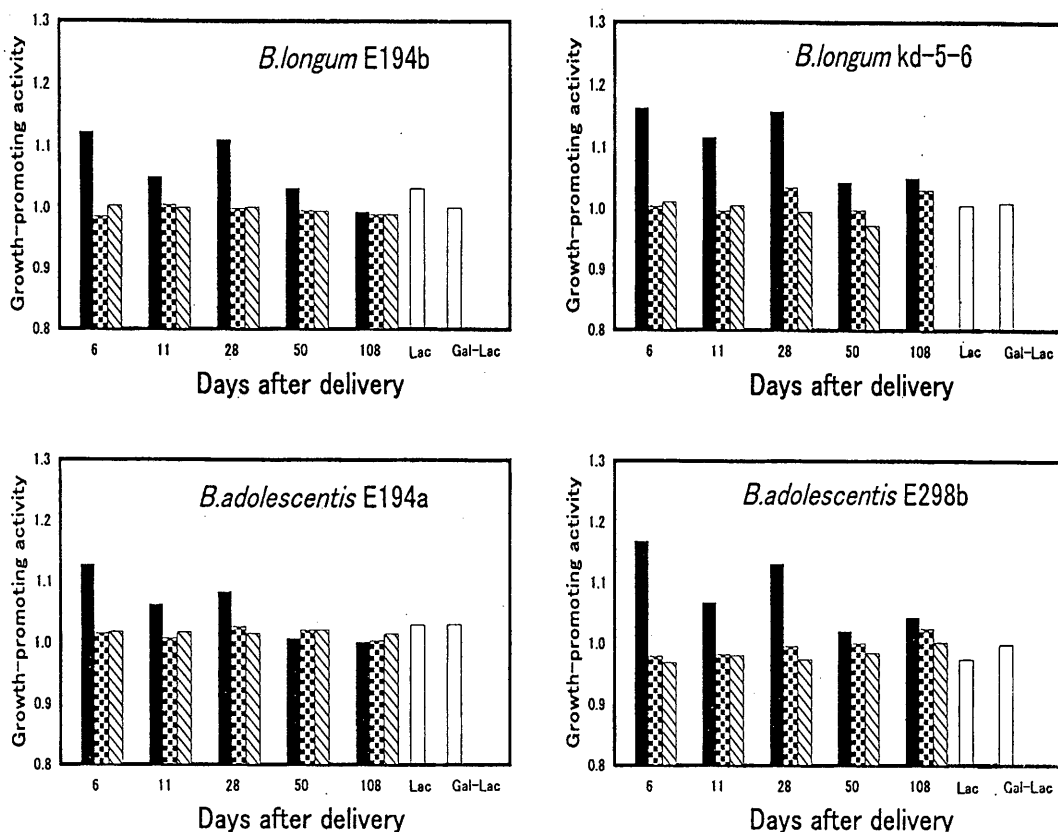


Fig. 3-3 Growth-promoting activity of extracted and partitioned oligosaccharides fraction from human milk on *B. longum* and *B. adolescentis*  
 (■) crude oligosaccharides fraction  
 (▨) neutral oligosaccharides fraction  
 (▧) acidic oligosaccharides fraction

*B. longum*, *B. adolescentis* 11 菌株のビフィズス菌に対する増殖促進活性の検討を行った。その結果、11 菌株中 8 菌株でいずれかの糖質画分にビフィズス菌増殖促進活性が認められた。そして、各泌乳期の粗糖質画分の活性の変化について検討した結果、11 菌株中 7 菌株が先の *B. bifidum* (IFO14252) と類似した傾向を示した。つまり増殖促進活性は出産後 6 日目のミルクから得た粗糖質を供試した時に最大値を示した後、減少し、11 日目に低値を示した。その後、再度活性が高くなり 28 日目には 6 日目と同程度の高値を示した。その後は泌乳期を経るごとに徐々に活性は低下した。何故、このような傾向を示すかについては不明点が多い。しかし、『新生児が無菌状態で生まれ、*E. coli*, *Streptococcus* などが

最初に出現し、その後 3 日目から *Bifidobacterium* が出現し、1 週間で最優先菌となり、腸内細菌叢のバランスが生後 10~20 日目の間に安定する』という腸内細菌叢の変化が深く関与していることが示唆される。つまり出産後 5~6 日目にビフィズス菌が最優勢菌となるまでは、*E. coli*, *Streptococcus* の増殖を抑え、ビフィズス菌の増殖を助長する物質の必要性がある。そして、腸内細菌叢の安定期には物質の分泌が徐々に減少することが予測される。つまり、腸内細菌叢を調整するために、増殖促進活性を有する物質の分泌調節が行われていることが示唆される。

又、ヒト乳中酸性糖質画分は、*B. infantis* (15075 I-10-5), *B. breve* (b S46), *B. bifidum* (IFO14252) に対

して増殖促進活性が認められた。この結果から、乳幼児期の最優勢菌である *B. breve*, *B. infantis* の増殖促進活性とヒト初乳中に多く存在する酸性オリゴ糖の関与が予測された。TLC 分析の結果から、初乳から常乳へと移行するに従いシアル酸含有オリゴ糖の減少は認められたが、その組成の大きな変動は認められなかった。

一般的に、母乳栄養児はビフィズス菌の数が多く、病原菌、大腸菌群などが少なく、人工栄養児はその反対であるという特徴を持つ。<sup>19)</sup>つまり、胎児の腸内菌叢の変化は乳によって大きく異なることが明らかである。又、乳の影響ばかりでなく、プロバイオティックは腸管内でコロニー化することから、腸内上皮細胞を覆っている粘液層も同時に重要な役割をしていることが考えられる。粘液層は、上皮細胞への病原菌類の接着をバリアーする役割、微生物を接着させ棲息させる役割を担っている。更に、ビフィズス菌は、加齢や摂取食物、宿主の生理機能によって、菌種の変化やビフィズス菌の減少、消失が起こる。腸内ビフィズス菌を優勢な状態に保つことが、健康の指標である。

現在までに、ビフィズス菌増殖促進因子である数々のオリゴ糖が見出されている。本実験では、Lactose, Gal-Lac を対照として増殖促進因子の検討をしたところ、ヒト乳中により強い増殖促進因子が存在する、あるいは複数のビフィズス因子が相乗的に作用していることが考えられた。Idota らは、SL は *B. infantis* (ATCC15697) によってのみ資化された。一方、増殖には関与していないと報告している。<sup>20),21)</sup>しかし、本実験の結果から酸性オリゴ糖は資化とは別の増殖促進活性因子として作用していることが予測された。

一方、ウシ初乳及び常乳そして加工乳から得た粗糖質画分 4 mg/培地 5 ml 添加した際に、*B. bifidum* (IFO14252) の増殖促進活性が認められなかった。加工乳の粗糖質画分についても同様の結果となった。ウシとヒト乳から得た粗糖質画分の結果の差異は、オリゴ糖の分子種、量が動物種間で大きく異なることを考慮すれば必然的なことでもある。糖質の単糖組成は哺乳類間で差異が存在するのはもちろん、真獣類や有袋類とは更に大きく異なっている。<sup>22),23)</sup>各動物種間の生物学的な要求性の違いからオリゴ糖を選択し、長い年月をかけて微妙な糖鎖構造の差異が生じたものと考えられる。そしてそれは、大変重要な出産直後に分泌される初乳の生理機構との関与が予測される。Montreuil, Mullet らが、Lac を除く

ミルクオリゴ糖は、初乳に 2.4%，常乳で 1.2～1.3% 含有しており、ヒト乳中構成成分の水、乳糖、脂肪に次ぐ第 4 番目の構成成分であると報告<sup>24)</sup>していることからヒトの乳におけるオリゴ糖の重要性が予測される。

ビフィズス菌の増殖促進活性には、プロバイオティックス、腸管の糖脂質、腸管粘液などの様々な因子が相互的に関与して腸内環境が作られ<sup>25)</sup>、種々の疾病防御の役割を担っていることが考えられるが、詳細な検討は十分になされていない。今後、乳中から精製した糖鎖の泌乳期変化とビフィズス菌増殖促進活性との関与について検討し、資化糖ではなく増殖促進活性を有するオリゴ糖の構造について検討したい。

## 謝 辞

ビフィズス菌を供与頂いた森永乳業(株)、母乳試料を供与頂いた方々に感謝いたします。本研究の実験にご協力頂いた食品学第二研究室平成11年度卒論生の関貴子さんに感謝いたします。

## 参考文献

- 1) G. V. Coppa, O. Gabrielli and P. Giorgi: *The Lancet*, **335**, 569-571 (1990)
- 2) C. Kunz and Silvia Rudloff: *Acta Paediatr*, **82**, 903-912 (1993)
- 3) P. McVEAGH and J. BRAND MILLERR: *J. Paediatr. Child Health.*, **33**, 281-286 (1997)
- 4) 清澤功: 母乳の栄養学, 163-179 (1998)
- 5) Mitsuoka, T., K. Hayakama, and N. Kimura: *Zbl. Bakteriolog. Hyg., I. Abt. Orig.*, **A226**, 469-478 (1984)
- 6) 馬田三夫: ビフィズス菌の化学, 1-10 (1989)
- 7) Haenel, H., W. Muller-Beuthw, and F. L. Gutter: *Zbl. Bakteriolog., I. Abt. Orig.*, **215**, 333-347 (1970)
- 8) György, P.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **24**, 970 (1971)
- 9) 北畑寿美雄: *FFI JOURNAL*, **178**, 11-18 (1998)
- 10) J. Parkkinen and J. Finne: *Methods Enzymol.*, **138**, 289-300 (1987)
- 11) 川名広子, 齋藤尚子, 有田政信: 東京家政大学紀要, **38**, 51-57 (1998)
- 12) 有田政信, 川名広子: 東京家政大学研究紀要, **36**, 17-24 (1996)

- 13) K. Ohara, M. Sano, A. Kondo, and I. Kato : *J. Chromato.*, **586**, 35-41 (1991)
- 14) Renner : Micronutrients in Milk and Milk based Food Products, 192-197 (1989)
- 15) Robert G. Jensen :  
Handbook of Milk Composition, 289-337 (1995)
- 16) Ito M, Kimura M, Deguchi Y, Miyamori-Watanabe A, Yajima T, Kan T : *J. Nutr. Sci. vitaminol.*, **39** (3), 279-288 (1993)
- 17) Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, Marteau P, Flourie B, Bornet F, Rambaud JC : *J. Nutr.*, **129** (1), 113-116 (1999)
- 18) Rubaltelli FF, Biadaioli R, Pecile P, Nicoletti P : *J. Perinat Med.*, **26** (3), 186-194 (1998)
- 19) Kleesen B, Bunke H, Tovar K, Noack J, Sawatzki G : *Acta Pediatr.*, **54** (12), 1347-1356 (1995)
- 20) T. Idoda, H. Kawakami and I. Nakajima : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58** (9), 1720-1722 (1994)
- 21) I. Tadashi : *SNOW BRAND R&D REPOTS*, **106**, 1-55 (1996)
- 22) M. Messer : 化学と生物, **133**, 816-824 (1995)
- 23) T. Urashima and T. Saito : 化学と生物, **31**, 80-82 (1993)
- 24) Montreuil, J. and Mullet, S. : *Bull. Sci. Chim.*, **42**, 365 (1960)
- 25) A. C. Ouwehand, P. V. Kirjavainen, M. -M. Gronlund, E. Isolauri, S. J. Salminen : *International Dairy Journal*, **9**, 623-630 (1999)

#### Abstract

It is known that the intestinal microflora of infants is formed between the 10th and the 20th day after birth and that its composition is affected by the kind of milk which infants take, i.e. breast milk or formula. In this study, a crude saccharides fraction, a neutral oligosaccharides fraction, and an acidic oligosaccharides fraction, extracted from human milk, were analyzed by the method of TLC. Then the growth-promoting activity of each fraction on eleven types of *Bifidobacterium* was determined by quantitative investigations of produced organic acid in culture medium. The growth-promoting activity of the crude saccharides fraction from human milk was highest on the 6th day after childbirth, then decreased till the 10th day, then increased till the 28th day, and decreased again after that. And it is interesting to find that the neutral and acidic oligosaccharides fractions from human milk showed high growth-promoting activity on *B.breve* (S46) and *B.infantis* (S12, 15075 I-10-5), which are dominant in the intestines of infants. However, the crude saccharides fractions from bovine and processed milk showed no growth-promoting activity on *B.bifidum* (IFO14252).