

ミルクオリゴ糖のビフィズス菌に対する 増殖促進活性(第2報)

川名(海老塚)広子*, 池田 真優子*, 有田 政信*

(平成 13 年 10 月 4 日受理)

Growth-promoting activity of milk oligosaccharides on *Bifidobacterium*(2)

Hiroko KAWANA(EBIZUKA), Mayuko IKEDA and Masanobu ARITA

(Received on October 4, 2001)

キーワード: ビフィズス因子, ミルクオリゴ糖, ビフィズス菌, 有機酸

Key words: bifidus factor, milk oligosaccharide, *Bifidobacterium*, organic acid

緒 言

近年, 食品成分の機能性や有効性の解明が進められ, 生体調節機能物質を含んだ食品摂取による健康増進・維持が進められている。

母乳中には種々の感染防御物質を含有していることから, 母乳栄養児は人工栄養児と比較して, 感染症等の疾病に罹患しにくく, 罹患した時の死亡率が低いことが明らかとなっている^{1)~3)}。その理由の一つとして, 腸内細菌叢が, 共生, 拮抗関係を維持し, 食物や消化管分泌物を栄養素とし増殖, 排泄を繰り返す, 宿主の健康維持, 増進を支えていることが考えられている。

ヒトの腸内細菌フローラとして検出される主要菌群は, ビフィズス菌, 乳酸桿菌, 腸球菌などの乳酸菌群, バクテロイデス, 嫌気性連鎖球菌, クロストリジウムなどの嫌気性菌群, 大腸菌, ブドウ球菌, 緑膿菌, 酵母などの好気性菌群に大別される。乳酸菌群は, ビタミンやタンパク質合成, 消化吸収の補助的役割をもち健康維持に関与する有用菌であり, 大腸菌やクロストリジウムの一種であるウェルシュ菌などは, 腸内腐敗, 発癌物質生成, 毒素生成に関与する有害菌である。更に, ストレスや薬物投与などの人体要因が重なると下痢, 胃腸炎, 感染症などを誘引する病原性菌も存在している。

有用菌である乳酸菌やビフィズス菌は, 糖質を分解し

て乳酸, 酢酸などの酸を産生し, 腸管の重要な栄養素となり腸管の細胞増殖, 消化促進, 腸管免疫増強に関与している。さらに, 腸内を酸性にすることにより有害菌数が減少し, 相対的に乳酸菌群などの有用菌数が増加すると腸内環境が改善され細菌性下痢症などの感染症への罹患率が低下する。また, 産生された有機酸は, 腸の蠕動運動を刺激し排便を促す便秘予防効果があると考えられている。

腸内細菌のバランスは, 加齢により変化していくが, 摂取食物, ストレス, 抗生物質などの強い薬物, また宿主の生理機能などの要因によっても, 菌種の変化やビフィズス菌の減少や消失が起こる。

ビフィズス因子の検索は, György らによりヒトミルク中に含まれている N-アセチルグルコサミンを含むオリゴ糖に始まり⁴⁾, その後糖ペプチド, 糖タンパク質, オリゴ糖などについて検討されてきた。

乳中に含有されるシアル酸含有オリゴ糖がビフィズス菌に対してどのような影響を与えるかについては未だ明らかとされていない。そこで本研究では, 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 (*B. infantis*)2 菌株に対する増殖促進活性を酸度滴定法及び高速液体クロマトグラフィー法により検討を行った。

実験材料及び方法

1. 実験材料

試験に用いたビフィズス菌は, *B. infantis* S12,

* 栄養学科 食品学第二研究室

B. infantis 15075 I-10-5 の 2 菌株で, これらの菌株は森永乳業(株)より供与された。基本培養培地は, 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~50 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。精製中性糖として用いた Lac, 3'-Fucosyllactose, 2'-Fucosyllactose, Lacto-N-triose, Lacto-N-tetraose は, SIGMA CHEMICAL CO. から購入した。Gal-Lac, Gal-Gal-Lac, Gal-Gal-Gal-Lac は日新製糖(株)より供与された。

精製酸性糖として用いた Sialyllacto-N-neo-tetraose, 6'-sialyllactosamine, 6'-sialyllactose, 3'-sialyllactosamine, 3'-sialyllactose, 3'-sialyl3'-fucosyllactose は, SIGMA CHEMICAL CO. から購入した。

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

ヒト, ウシ乳から粗糖質画分の抽出は, Folch の分配法により行った⁵⁾。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, 蒸留水での溶出画分を中性糖質画分, 1300mM ピリジン酢酸緩衝液(pH5.0)での溶出画分を酸性糖質画分として, 凍結乾燥をおこなった。ヒト乳から得た粗糖質画分, 中性糖質画分, 酸性糖質画分を, 前報に従って薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開後, 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^{6)~7)}。又各画分は, 水で溶解し Gelman sterile Acrodisc 0.45 μ m により濾過滅菌を行い, ビフィズス菌増殖促進活性の測定試料とした。

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, 均一に懸濁した後, 新しい培地入り試験管へ 100 μ 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⁸⁾。

4. ビフィズス菌増殖促進活性度の測定方法

ヒト乳(出産後 6, 11, 28, 50 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)から得た粗糖質画分および市販の中性および酸性オリゴ糖を試料として増殖促進活性を測定した。各糖試料の濃度が 100 μ g/培地 5 ml となるように培地中に添加し十分に攪拌した後, 前述の方法で前培養したビフィズス菌を一定量接種して, 24 あるいは 30 時間, 37°C, 嫌気条件下(Gas Pak)の保温器内で培養を行った。対照としては, 糖試料無添加培地で培養したものをを用いた。一定培養後, 前報に示した方法によって酸度測定を行った。増殖促進活性度は, 糖試料無添加培地の酸度に対する供試試料添加培地の酸度の比率として, 次の計算式によって求めた。

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

5. ビフィズス菌培養培地中の酢酸及び乳酸の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量分析方法

酸度滴定を実施した培地 1.5ml に, 15.8N 硝酸 100 μ l を加えてタンパク質を変性した後, 遠心分離(3000rpm, 5°C, 20min)によって得られた上澄液を, Millex-HV (0.45 μ m) により濾過を行い, HPLC の溶出溶媒で希釈して分析試料とした。

HPLC による分析は, CLASS-LC10 (島津製作所製) 高速液体クロマトグラフィー装置で, 流速 1.0ml/min, カラム温度 40°C, 検出は UV210nm により行った⁹⁾。分析カラムは, 逆相系の Inertsil ODS-3V column (4.6mm I.D. \times 250mm; ジーエルサイエンス(株)製)を用い, 溶出溶媒はリン酸を添加して pH3.5 に調整した 0.1M リン酸 2 水素アンモニウム溶液を用いた。

結 果

1. 乳中糖質画分の分画

ヒト乳に含有される中粗糖質量は, 分析を行った分娩後 6 日目から 50 日目の期間で, 約 6.7% ではば一定値を示した。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結果, 粗糖質中, 中性糖は 6 日目で 82% で, 泌乳期を経るに従って僅かに増加し, 50 日目では 89% となった。一方, 酸性糖質の含有量は, 出産後 6 日目が最高で約 6.7%, その後泌乳期を経るに従って徐々に減少し, その値は 11 日目で 6.3%, 28 日目は 6.1%, 50 日目には 5.3% であった。

2. ヒト乳から得た粗糖質画分、中性糖質画分および酸性糖質画分のビフィズス菌増殖促進活性度

まず、ヒト乳(6, 11, 28, 50日目)から得た粗糖質画分、中性糖質画分、酸性糖質画分によって、乳幼児期の腸管内に主として存在する *B. infantis* S12(培養時間24時間)及び *B. infantis* I-10-5(培養時間30時間)にたいして増殖促進活性度を測定した結果をFig. 1に示した。その結果、両菌株に対して6日目の粗糖質画分及び酸性糖質画分が最も高い増殖促進活性が認められ、11日目には活性がほとんど認められなかったが、28日目の粗糖質画分及び酸性糖質画分は6日目と同程度まで活性が回復し、50日目以降では全ての画分ではほとんど活性は認められなかった。両菌株に対する中性および酸性糖質画分の増殖促進活性度を全体的に比較すると、*B. infantis* (I-10-5)の方が *B. infantis* (S12)よりやや強い増殖度を有することが判明した。

中性糖質画分は、*B. infantis* (I-10-5, S12)の2菌株について増殖促進活性が認められなかった。なお、同時に試験した糖質のLactoseとGal-Lacではわずかに増殖促進活性が認められた。

3. ヒト乳から得た粗糖質、中性、酸性糖質画分を添加した時の *B. infantis* の産生する酢酸及び乳酸の定量

増殖促進活性と *B. infantis* (I-10-5)の産生する有機酸量(乳酸及び酢酸)の関連を検討するため、ヒト乳の6,

11, 28, 50日目から得た粗糖質画分、中性糖質画分、酸性糖質画分の増殖促進活性試験時の乳酸と酢酸の産生量とその割合をHPLC法によって行った。その結果をFig. 2に示した。各泌乳期および各糖質画分によって産生された乳酸と酢酸の総量は僅かに変動しているが、この変動は酸度滴定の変動と相関していた。しかしながら、最も高い乳酸・酢酸総量は、酸度滴定によって最も強い増殖促進活性を示した6日目ではなく、28日目の粗糖質及び酸性糖質画分であった。この時産生された乳酸・酢酸量は、培養培地1μlあたり約 15×10^{-2} nmolであった。対照とした培養培地でも、酸度滴定では最も低い値となるが、乳酸・酢酸の産生総量は試験群と変わらなかった。次に、乳酸と酢酸量のモル比率をFig. 3に示した。酢酸1モルに対して乳酸は約0.78モルの比率で存在し、全泌乳期を通じてモル比率の大きな変動は認められなかった。これらのことから、増殖促進活性の認められた糖質画分では、乳酸・酢酸の産生ではなく、他の有機酸が産生されることによって滴定酸度が上昇することが予測された。

4. ウシ乳から得た粗糖質、中性、酸性糖質画分の *B. infantis* に対する増殖促進活性

同様にウシ乳(初乳、常乳)中より得た粗糖質、中性、酸性糖質画分の *B. infantis* (S12, I-10-5)に対する増殖促進活性の検討を行った。その結果、*B. infantis*

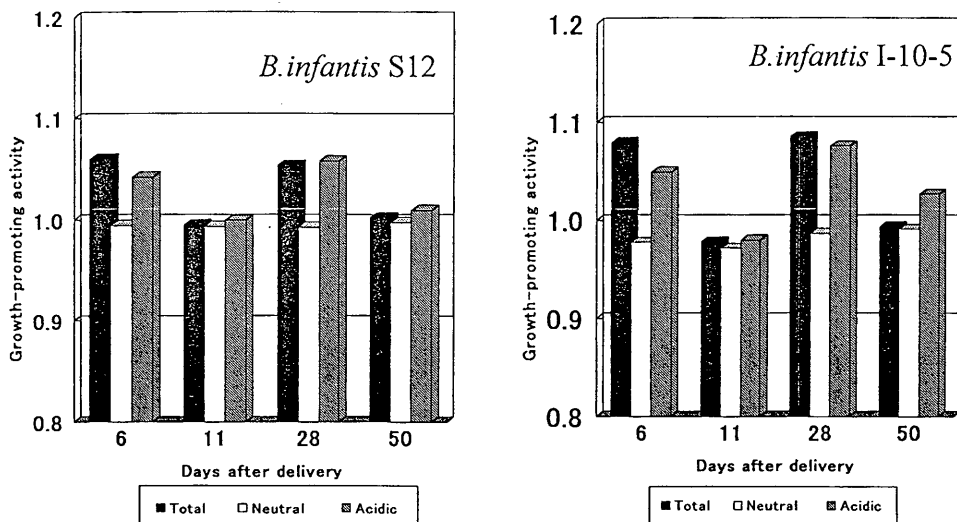


Fig.1 Growth-promoting activity of each oligosaccharides fraction from human milk on *B. infantis*

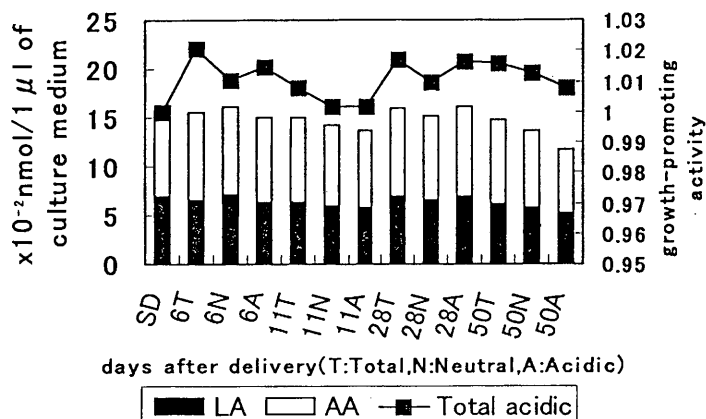


Fig.2 The amount of produced acetic and lactic acids, and the ratio of total organic acid against control

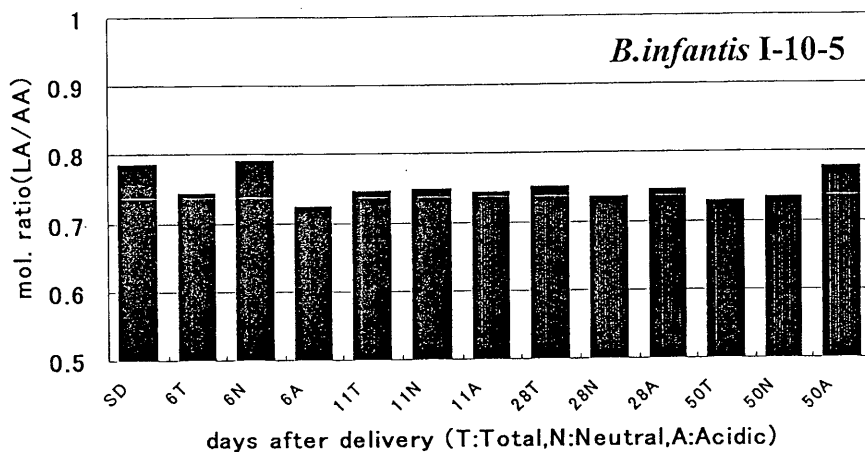


Fig.3 Molecular ratio of produced lactic and acetic acids by *B. infantis* 15075 I-10-5

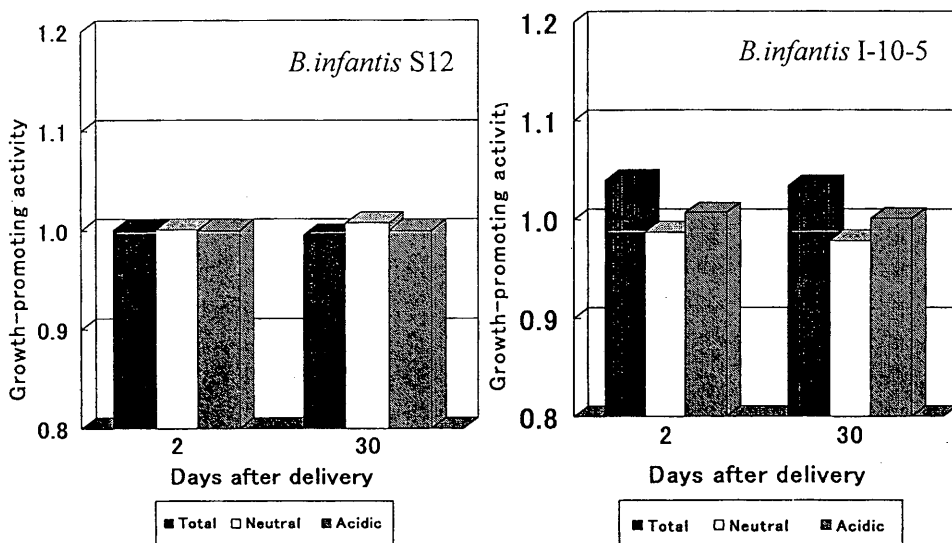


Fig.4 Growth-promoting activity of each oligosaccharides fraction from bovine milk on *B. infantis*

(S12) に対しては、初乳及び常乳の全ての糖質画分において増殖促進活性が認められなかったが、*B. infantis* (I-10-5) に対しては、初乳及び常乳の粗糖質画分において僅かな増殖促進活性が認められた。しかし、中性、酸性糖質画分では活性が認められなかった。

(Fig. 4 挿入)

5. 精製中性糖質及び酸性糖質の *B. infantis* に対する増殖促進活性

B. infantis (S12, I-10-5), *B. breve* (a S1, S46) の増殖に及ぼす精製中性糖質、精製酸性糖質の影響を、培養培地の酸度滴定法により検討した結果を Fig. 5, 6 に示す。*B. infantis* の2菌株に対して、8種の精製中性糖質の増殖促進活性を検討した結果、各試料の供試濃度ではヒト乳中から得た粗糖質画分のような増殖促進活性は認められなかった。逆に *B. infantis* (I-10-5) に対しては、Lac 以外の精製中性糖質は増殖促進を抑制するかのよう現象が認められた。また、ヒト乳中から得た酸性糖質画分で増殖促進活性が認められたことから、乳中から精製したシアル酸含有オリゴ糖6種の増殖促進活性の検討を行った結果、すべての精製酸性糖質において増殖促進活性は認められなかった。

考 察

近年、人工栄養児のための調整粉乳は、ガラクトシルラクトース、フラクトオリゴ糖、ラクチュロースなどを

配合し、人工栄養児の腸内細菌叢の改善をすることによって生体防御機能の付加が盛んに行われている。しかしながら、母乳栄養児はビフィズス菌数が多く、病原菌、大腸菌群などの有害菌が少ないという特徴を持ち腸内環境が人工栄養児とは異なる^{1)~4), 10), 11)}。発展途上国などの不衛生な地域では特に腸管感染症などへの疾病率に差異のあることが指摘されている。胎児の腸内菌叢の変化は栄養源である乳により大きな影響を受けていることは必然である。

前報⁸⁾で乳幼児期から老年期までのヒト腸管内に生息する11菌株のビフィズス菌に対する母乳から得た粗糖質、中性糖質、酸性糖質の影響について報告した。そして酸性糖質画分を添加した時、*B. infantis* と *B. breve* の増殖促進活性効果が認められた結果から、今回は乳幼児期に多く生息する菌株 (*B. infantis*) に注目しビフィズス菌を増殖させる成分、ビフィズス因子の検索を行った。

ヒト乳中には種々のビフィズス因子が含まれていると考えられ、その成分を探索する研究が盛んに行われている。Györögy らは、ヒトミルクオリゴ糖である N-アセチルグルコサミン含有オリゴ糖にその活性が存在することを発見した⁴⁾。その後、カゼイン、タンパク質分解物、シアロ糖タンパク質にも活性が認められてきている¹¹⁾。今回の糖試験濃度で検討したところ、*B. infantis* (15075 I-10-5, S12) の2菌株では乳中から得た中性糖質画分、精製した中性糖質8種では増殖促進活性がほとんど認められなかった。つまり、ミルクオリゴ糖では、

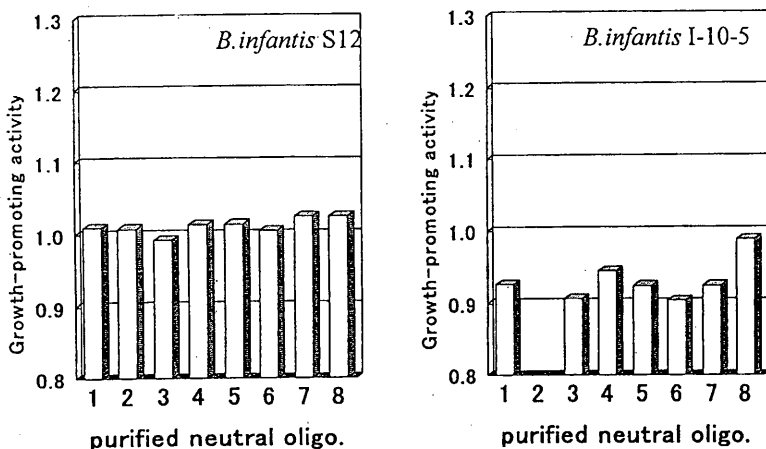


Fig.5 Growth-promoting activity of purified neutral oligosaccharides on *B. infantis*
 1:Gal-Lac 2:3'-fucosyllactose 3:2'-fucosyllactose
 4:Lacto-N-triose 5:Gal-Gal-Lac 6:Lacto-N-tetraose
 7:Gal-Gal-Gal-Lac 8:Lactose

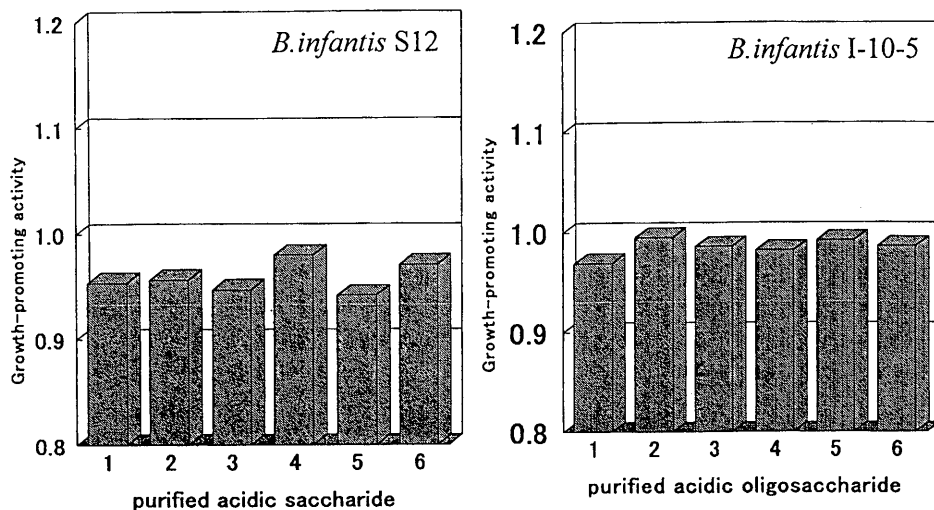


Fig.6 Growth-promoting activity of purified acidic oligosaccharides on *B. infantis*

1:sialyllacto-N-neo-tetraose 2:6'-sialyllactosamine 3:6'-sialyllactose
4:3'-sialyllactosamine 5:3'-sialyllactose 6:3'-sialyl3'-fucosyllactose

中性糖質画分が低濃度である場合は、それだけでは活性は認められないけれども酸性糖質と混在すると増殖促進活性が存在することから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。

一方、酸性オリゴ糖について井戸田らは、シアリルラクトースは *B. infantis* (ATCC15697) により資化されるが、増殖には関与していないと報告している^{12), 13)}。今回の実験で *B. infantis* S12, *B. infantis* I-10-5 の増殖促進活性を酸度滴定法と HPLC 分析法により酸産生量の変動を比較したところ、6, 28 日目の粗糖質画分及び酸性糖質画分で高い増殖促進活性が認められた。中性糖質ではなく酸性糖質画分で高い活性が認められたことより酸性オリゴ糖は資化あるいは資化ではない増殖促進活性因子としてビフィズス菌に対して作用していることが示唆された。ヒト乳と比較して、ウシ乳から得た粗糖質、中性、酸性糖質画分の *B. infantis* 増殖促進活性を測定したところ、増殖促進活性はほとんど認められなかった。György らはヒトとウシミルクのビフィズス菌増殖活性が 40:1 でそれらのシアル酸含量と等しいことを報告している¹⁴⁾ ことから主要酸性オリゴ糖であるシアル酸含有オリゴ糖の果たす役割の重要性が示唆される。岩崎らはビフィズス菌が母乳栄養児の優性菌である因子として、 α -L-フコシダーゼ及びノイラミニダーゼなどの酵素を有しており¹⁵⁾ 複雑な高分子構造であるヒトミルクオリゴ糖を利用できると考えている¹⁶⁾。そして、

ビフィズス菌に特異的に利用される糖は N-アセチルグルコサミンあるいはシアル酸を含むと予測されている。本研究の結果からも酸性オリゴ糖画分には中性糖質画分よりもビフィズス菌の強い増殖促進活性が認められた。

無添加糖質の培養培地は、酸度滴定法による検討では他と比較して低値であるが、乳酸と酢酸産生量は試験群とほぼ同等であった。このことから、ヒトミルクオリゴ糖を添加することにより他の酸が産生されていることが予測された。そして、この菌株についてみると酢酸 1 モルに対して乳酸は約 0.78 モルの比率で存在し、全泌乳期を通じてモル比率の大きな変動は認められなかった。

ビフィズス菌の増殖促進活性には、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、酸性オリゴ糖の果たす役割についての詳細な検討は十分になされていない。ビフィズス因子の探索を行う時、オリゴ糖には、(1)宿主により非(難)消化性であること、(2)ビフィズス菌以外の腸内細菌に資化されにくいこと、(3)安全であることなどの性質が要求される。今後、泌乳期間により分泌される各糖鎖を精製し、各ライフステージによる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探索したい。

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井原美香さん、平成12年度卒論生の青木理恵さんに感謝いたします。

参考文献

- 1) Kleesen B, Bunke H, Tovar K, Noack J, Sawatzki G : *Acta Pediatr*, **54** (12), 1347-1356 (1995)
- 2) C. Kunz and Silvia Rudloff : *Acta Pediatr*, **82**, 903-912 (1993)
- 3) P McVEAGH and J BRAND MILLERR : *J. Pediatr. Child Health.*, **33**, 281-2286 (1997)
- 4) György, P., and Rose, C. S. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**, 219-233 (1955)
- 5) J. Parkkinen and J. Finne : *Methods Enzymol.*, **138**, 289-300 (1987)
- 6) 川名広子, 齋藤尚子, 有田政信 : 東京家政大学紀要, **38**, 51-57 (1998)
- 7) 有田政信, 川名広子 : 東京家政大学研究紀要, **36**, 17-24 (1996)
- 8) 川名広子, 有田政信 : 東京家政大学紀要, **41**, 19-26 (2001)
- 9) U. K. DUBEY and V. V. MISTRY : *J. Dairy Sci.*, **79**, 1146-1155 (1996)
- 10) G. V. Coppa, O. Gabrielli and P. Giorgi : *The Lancet*, **335**, 569-571 (1990)
- 11) BRYON W. Petschow and ROBERT D. TALBOTT : *Pediatric Research*, **29**, 208-213 (1991)
- 12) T. Idoda, H. Kawakami and I. Nakajima : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58** (9), 1720-1722 (1994)
- 13) I. Tadashi : *SNOW BRAND R&D REPOTS*, **106**, 1-55 (1996)
- 14) György, P. : *Am. J. Cli. Nutr.*, **24**, 970-975 (1971)
- 15) 岩崎泰助 : 雪印乳業研究所報告, **89**, 101-186 (1990)
- 16) B. Passerat, A-M Desmaison : *Nutrition Research*, **15** (9), 1287-1295 (1995)

Abstract

In this study, we have examined changes in the growth-promoting activity of milk oligosaccharides on *B.infantis*. Sample of Human milk was obtained from a healthy mother from the 5th day till the 50th day after childbirth. The growth-promoting activity of the total and acidic oligosaccharide fractions from human milk were highest on the 6th day after childbirth, then decreased till the 11th day, then increased till the 28th day, and decreased again after that. And it is interesting to find that the acidic oligosaccharide fractions from human milk showed high growth-promoting activity on *B.infantis* (S12, I-10-5). Produced total organic acids varied, but the mole ratio of produced acetic and lactic acid by *B.infantis* was invariable (1:0.73). However no oligosaccharide fractions from bovine milk and purified neutral and acidic oligosaccharides showed any growth-promoting activity on *B.infantis*. Mixture of neutral and acidic oligosaccharides possessed a growth-promoting activity on bifidobacteria but individual purified oligosaccharide didn't show the activity.