

〈研究ノート〉

発酵した各乳製品に含まれるビフィズス菌の モデル消化液中における生存性

黒飛 知香*・多山 賢二**

(受付 2023年5月2日)

要 約

牛乳発酵製品には、腸内環境の正常化に寄与するビフィズス菌を用いたものも発売されている。ビフィズス菌は、生きた状態で大腸まで到達することによって機能を示すが、異なるビフィズス菌間で、消化液や大腸液での生存性を比較する実験データはほとんど報告されていない。そこで我々は、市販品を購入し、これらに含まれている生きたビフィズス菌が、体内モデル消化液と37℃で接触した後の残存生菌数を測定した。8製品（7社）を購入し、まずモデル胃液と1時間接触させ、次にモデル小腸液と22時間接触させ、残存する生菌数を測定した。その結果、メーカーの間に大きな違いが認められ、元の1/10,000未満にまで死滅した製品がある一方で、ほとんど死滅しない製品も見出された。次に、プロピオン酸を含む希釈したビフィズス菌増殖用培地に酢酸を添加したモデル大腸液を調製し、ここに上記の実験から選択された優れた4製品を加えて、24時間、37℃で嫌氣的に放置した。その結果、元の1/1,000近くまで減少したものがある一方で、ほとんど死滅しない製品もあった。*in vivo*の実験結果ではないものの、ビフィズス菌の効果を期待して我々が摂取する場合の優先順位に関して、活用できるデータと思われた。

キーワード 腸内環境, ヨーグルト, ビフィズス菌, 生存性

1. 緒 言

国内の発酵乳（ヨーグルト）の市場が、2020年で5,000億円弱規模と推定されている¹⁾中で、各食品メーカーからは様々なヨーグルトが発売されている。ヨーグルトはプロバイオティクスとしての乳酸菌やビフィズス菌を含み、近年では免疫活性化が注目されている²⁾。腸内環境の正常化に寄与する乳酸菌は有名であったが、近年ではビフィズス菌入りの製品も発売されるようになり、その種類は多岐にわたっている。

ビフィズス菌は乳酸菌と性質が異なり、偏性嫌気性細菌であることから、大腸のような酸素が存在しない場所でしか生存・増殖できないという特徴を有する。また、糖を発酵して生

* 広島修道大学健康科学部健康栄養学科

** 県立広島大学地域創生学部地域創生学科

成する有機酸は、乳酸よりも酢酸が多いという性質を示す。つまり、我々が摂取した生きたビフィズス菌が働く部位は大腸であるため、たとえ製品中に含まれているビフィズス菌が多い場合でも、胃液・小腸液・大腸環境によって簡単に死滅してしまえば何の意味もないことになる³⁾。したがって、各社製品中に含まれる生菌数を調べると同時に、モデル胃液・小腸液・大腸液と接触させ、どの程度生き残るかを調べるのが重要であると考えた。そこで主要乳業メーカーを中心に、広島市内で広く販売されているヨーグルト・発酵乳・飲料の8種(7メーカー)に関して、これらに含まれている生きたビフィズス菌の耐性・生存性について調べることを目的とした。その結果、想像以上にメーカー間において顕著な違いが認められたので報告する。

2. 方 法

1) サンプル, 試薬

各種ビフィズス菌入りの製品(ヨーグルト・発酵乳・飲料)は、2021年10月から2022年8月の期間に広島市内の小売店(スーパーマーケットやコンビニエンスストアなど)で購入し、賞味期限内に使用し、使用時までは冷蔵庫(4℃)に保管した。購入した市販製品は以下の通りである。(1) 森永「ビヒダス プレーンヨーグルト」450 g入り、関与成分としてビフィドバクテリウム ロンガム BB536を100 g当たり20億以上含有(以下, MB), (2) 雪印メグミルク「ナチュレ恵 プレーンヨーグルト」400 g入り、ビフィズス菌 SP株としてのビフィドバクテリウム ロンガム SBT2928を100 g当り10億個以上含有(以下, YU), (3) グリコ「Bifix プレーン ビフィックスヨーグルト」375 g入り(以下, GU), (4) ダノン「ヨーグルト プレーン・加糖」75 g入り(以下, DA), (5) 小岩井乳業「生乳100%ヨーグルト」100 g当たりビフィドバクテリウム ラクティス BB-12を40億個以上含有(以下, KO), (6) 森永「記憶対策ヨーグルト」発酵乳, 100 g容量, 機能性関与成分; ビフィズス菌 MCC1274 (*Bifidobacterium breve*)を200億個含有(以下, MK), (7) カゴメ「生きて腸まで届く ビフィズス菌」乳製品乳酸菌飲料, 100 mL容量, 機能性成分; ビフィズス菌 BB-12 (*Bifidobacterium animalis*)を10億個含有(以下, KA), (8) ヤクルト「ミルミル」発酵乳, 100 mL容量, ビフィドバクテリウム プレーベ BY株を100 mL当たり120億個以上含有(以下, YA)。

分析・調製用試薬には、ペプシン(ブタ胃粘膜由来・生化学用)、トリプシン(ブタ膵臓由来・生化学用)、パンクレアチン、コール酸ナトリウム(生化学用)および本文中で示す他の試薬(特級品)は特記しない限り和光純薬製を使用した。嫌気培養に使用する脱酸素剤のアネロパック・ケンキおよび透明ボックスのアネロパック角型ジャーは、三菱ガス化学製を用いた。培地は、TOSプロピオン酸寒天培地(ヤクルト薬品工業販売)を用いた。

2) ビフィズス菌数の測定法

45℃に保温した滅菌 TOS プロピオン酸寒天培地の 20 mL と段階希釈した試験液 0.1 mL とを混釈し、滅菌プラスチックシャーレ内で固め、脱酸素剤を入れた嫌気ジャー内で、37℃・3日間嫌気培養した。微小コロニーは、共存する乳酸菌であるためカウントしなかった。サンプルの希釈は、リン酸二水素カリウム 4.5 g, リン酸水素二ナトリウム 6 g, Tween 80 0.5 g, L-システイン塩酸塩 0.5 g, 寒天末（ナカライテスク製：一級）1 g を脱イオン水 1 L に加えてオートクレーブ滅菌した専用希釈液を使用した。測定は 3 回行い、サンプル 1 g もしくは 1 mL 当たりの生菌数をプレートで出現したコロニー数（CFU）として示し、サンプル間の有意差は統計処理によって判定した。グラフ上では常用対数として表示し、平均値 ± 標準誤差を示す形とした。

3) 人工消化液の耐性試験

人工胃液での処理は、東らの方法⁴⁾に準じて行った。サンプル 5 g と 5,000 倍希釈の濃塩酸（pH 3）10 mL とを滅菌遠心チューブ内で混合し、ここに 4 %（W/V）ペプシン溶液 0.125 mL を加えて、人工胃液環境とした。この混合液を 37℃ で 1 時間保持した。

次に、中村らの方法⁵⁾に準じて人工小腸液下での処理に移った。上記の人工胃液処理物 12 mL に 2 %（W/V）コール酸ナトリウム、1 %（W/V）パンクレアチン、1 %（W/V）トリプシンの最終濃度を示す三種混合溶液を 0.25 mL、および 0.1 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）を 15 mL 加え、人工小腸液環境とした。これを嫌気状態で 37℃・22 時間保持した。その後、直ちに専用希釈液で処理液を希釈し、生菌数を測定した。

4) 人工モデル大腸液中の耐性試験

人工モデル大腸液としては、ビフィズス菌が増殖可能な TOS プロピオン酸寒天培地をベースとした。これを培地として使用する際には、脱イオン水 1 L に 63 g の培地を懸濁・溶解させるが、これを室温にて行い、脱イオン水は 15℃ のものを使用した。この懸濁・溶解液に追加する形で、ガラクトオリゴ糖（和光純薬製）および粉末酵母エキス D-3H（日本製薬製）を各々の最終濃度が 1 %（W/V）となるよう添加した。その後この液を滅菌水で 10 倍に希釈し、ここに酢酸（和光純薬製）を最終濃度が 0.15 %（W/W）となるように加えたものを人工モデル大腸液とした（pH 4.85）。次にこの液を 0.45 μm の無菌フィルターでろ過し、ろ液に各市販製品を 1 % 分（W/W）となるよう加え、ゆっくりと 10 秒間、攪拌・混合した。サンプル添加直後および嫌気ボックスに入れた嫌気状態にて 37℃ で 24 時間放置後の 2 回、ビフィズス菌の生菌数を測定した。

5) 統計処理

多重比較検定では、分散が均一とみなせた場合には Tukey-Kramer 法を、均一とみなせない場合には Steel-Dwass 法を用いて検定した。各サンプル間の検定においては、危険率 5% 以下で有意差ありと判定した。

3. 結 果

図1には、モデル胃液・小腸液の処理による生菌数の変化を示す。処理後はサンプル濃度が薄まることから、全く菌の死滅がない場合でも「処理後」は元の製品の菌数の2割程度になる。この点を考慮すると、GU および DA の製品では、ビフィズス菌の死滅は生じていないことが明らかとなった。YA, MB は、やや生菌数が低下した一方で、YU, MK, KA, KO は顕著な生菌数の低下が認められた。

図2には、図1で死滅しにくい結果が得られた4製品について、モデル大腸液中で放置後の生菌数低下を調べた結果を示した。処理液に各種の製品が生菌として接種された後、0時間後と24時間後での生菌数であるため、ここでの生菌数の低下は各ビフィズス菌の24時間経過によるコロニー形成能の消失によるものと判断できる。モデル胃液・小腸液で非常に高い耐性を示した DA であったが、モデル大腸液中では1/1,000近くまで生菌数が低下した。MB および YA では、やや生菌数の低下が認められた一方で、GU は24時間後もほぼ同じ生菌数を維持していた。

図1と図2のデータを結合させ、3種の環境下で順次保持された場合、初発の生菌数がどのレベルまで低下するかを理論的に単純計算したものが図3である。DAとMB以外は比較

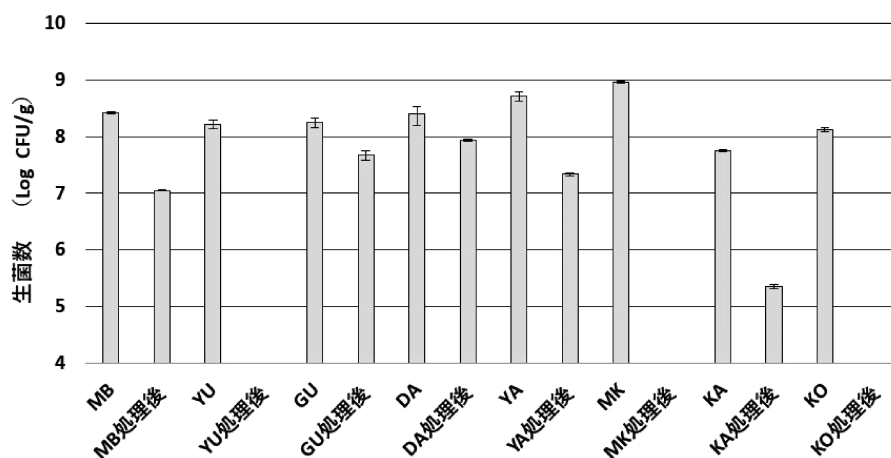


図1. 各製品の人工消化液での処理前後のビフィズス菌数

黒飛・多山：発酵した各乳製品に含まれるビフィズス菌のモデル消化液中における生存性

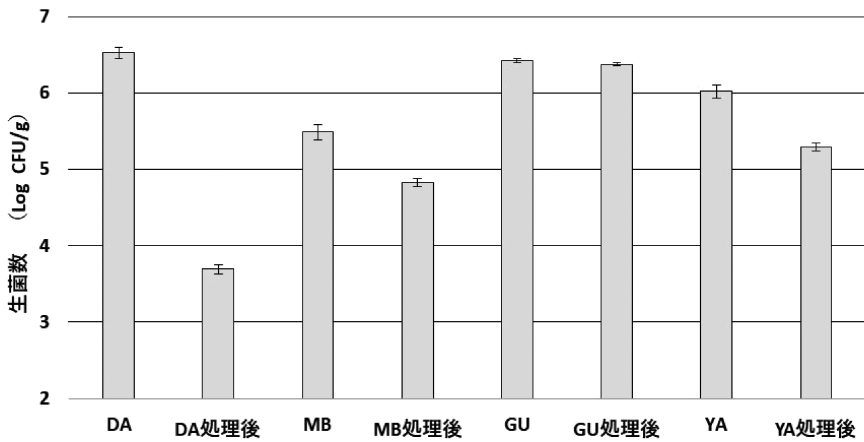


図2. 選抜された製品のモデル大腸液での処理前後のビフィズス菌数

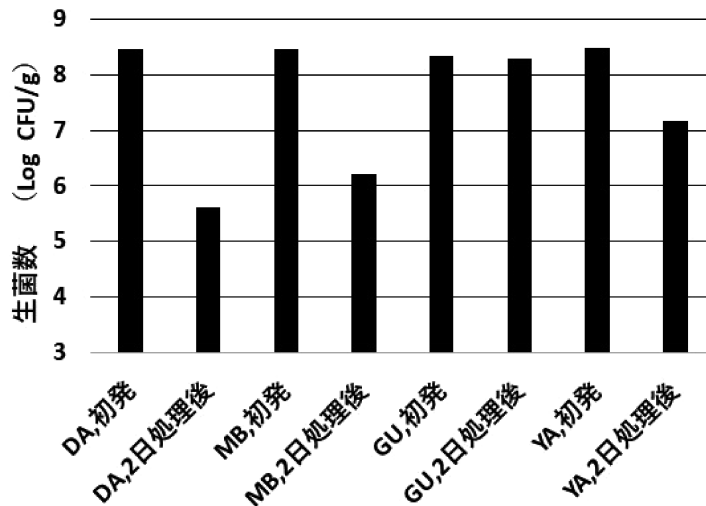


図3. 各製品のモデル消化管液（3種）による2日間処理後に残存する理論的ビフィズス菌数の濃度

初発：製品2ロットの平均生菌数を示した。2日処理後：処理液による希釈を考慮しつつ、図1での死滅率をまず算出。ただし図1上で処理後に0.2倍以上を示すものは、希釈の関係から死滅なし（死滅率=1.0）として計算。次に図2での死滅率を算出。図1と図2の死滅率を掛け合わせ、得られた数値と初発菌数を乗じた値を示した（例：生菌が1/10に低下の場合、死滅率は0.1）。

的の高い菌数を維持していることが示された。中でも、GU中のビフィズス菌は元の製品と比較して、ほとんど変わらなかった。

4. 考 察

著者らは、以前にも当時の市販製品中のビフィズス菌と乳酸菌の生菌数の濃度を測定し報告している⁶⁾。その論文中には商品名やメーカー名は記載していなかったが、今回は一部を明らかにしながら考察を加えることとした。まず、国内では規約によって、ヨーグルト（発酵乳）と呼ぶためには生きた乳酸菌が製品中に含まれていることが必須であり、規格通り全て1g当り1,000万個以上の生きた乳酸菌を含んでいた。ビフィズス菌入りであると商品ラベルに明記されていた製品には、これと共存する形で生きたビフィズス菌が確かに含まれており、1g当り100万個から2億個が検出された。さらに、大手メーカーが発売している2種のビフィズス菌入りヨーグルトを用いて、モデル胃液と腸液と接触させた後の生菌数を調べており、結果としてYUに含まれるビフィズス菌は急激な死滅が観察される一方で、MBに含まれるビフィズス菌は死滅するが、その速度が緩やかであることを報告している。モデル胃液・腸液の組成・条件はやや異なるものの、今回我々が調べた結果でも同様な知見を得ている。以上より、YUとMBの製造企業では、長年にわたり以前と同様の消化液耐性を有するビフィズス菌を用いて、ヨーグルトを生産していることが示唆された。

DAの提供メーカーは、高生存性のビフィズス菌を使用していることを強調しており、これは商品ラベルにも記載されているため、かなり自信を持った主張といえる。我々が行った今回の実験結果からも、確かに胃と小腸のモデル消化液耐性は最も優れていた。しかし、モデル大腸液中での生存性は、選抜された4製品の中で最も劣っていた。大腸内では腸内細菌によって生成された短鎖脂肪酸（酢酸やプロピオン酸など）が存在しており、これらに対する耐性を有することも優れたビフィズス菌の条件と考えられことから、この点も考慮した優れたビフィズス菌の利用を企業には期待したい。

GUの提供メーカーは一時期、摂取した自社ヨーグルト中のビフィズス菌が体内で増えることを強調した告知に力を入れていた。この企業は特許出願も行っており⁷⁾、これによると、ヒトでの摂取データから、ヨーグルトの形で摂取したビフィズス菌 (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505) は、摂取翌日には2倍もしくはそれ以上まで増え、1週間後には平均で11倍まで増えるとし、自社が提供するビフィズス菌の有用性を主張している。今回の我々の実験結果からは、モデル大腸液中での24時間後での増殖は生菌数の視点からでは確認できなかった。しかし、このモデル大腸液中で死滅することはなく、モデル胃液・小腸液中でも死滅しなかったことから、図3に示されるように、口から摂取した生きたビフィズス菌の絶対数が1～2日後でもほぼ100%体内に維持されることが示唆された。

図3での他のビフィズス菌においては、GUほどの高い生存性を示す菌は見出せなかった。

GUに関する特許のデータ（ヒト大腸内でビフィズス菌が増える事実）を考慮すると、図3でのGUの結果は、単に*B. animalis* ssp. *lactis* GCL2505が死滅しにくいというよりも、モデル大腸液中との初期の接触では菌がやや死滅していくとしても、途中からは増殖を開始し、1日の間に元の菌数まで増えた可能性も考えられる。大腸内の環境を試験管内で設定することは容易ではないが、酢酸もプロピオン酸も含んだ上で、ビフィズス菌の栄養源を加えた形で今回設定したことから、かなり参考になるデータを提示できたと考えている。

Shimizuら⁸⁾は、ビフィズス菌、乳酸菌、ガラクトオリゴ糖の混合物を重症感染症としての敗血症患者に入院後3日以内に投与し継続したところ、1週間後、非投与に比べて下痢が1/4以下（発生率6.3%）、肺炎発症が1/3以下（発生率14.3%）まで改善され、ビフィズス菌数と乳酸菌数が有意に高かったことを報告している。この混合物投与によって、便中の酢酸は1週間後に高濃度になっていた。本実験でモデル大腸液に添加した酢酸は、この研究結果での混合物投与前の濃度（25 mM）を考慮したものである。今後もし追加の実験を行う場合には、今回のモデル大腸液に、ギ酸、酪酸、乳酸をさらに少量添加することを考えてよいのかもしれない。

腸内細菌叢は個人差が大きい⁹⁾と言われている上に、GUの特許⁷⁾でも示されているように、ヒトでのビフィズス菌数の増え方はバラツキが大きい。試験管内での実験結果のほうが、菌種間の耐性の違いを同じ指標で解析できるため、むしろ有用であるとも言える。その意味で、今回の我々の比較実験は意義深い可能性があると思われた。食品メーカーの中には、自社菌の消化液耐性を、実験データを基に説明しているところもあるが¹⁰⁾、他社品との比較がなく、その良し悪しを我々消費者が判断しにくい状況にある。いくつかの研究が始まってはいるが¹¹⁾、今後より多くの研究が第三者によって行われ、ビフィズス菌間の違いが同一の実験条件下で相対比較されるようになることが待たれる。ビフィズス菌の摂取は、腸管出血性大腸菌 O157の感染予防に寄与するとの報告¹²⁾も出されている。今後も注目される有用細菌であり、研究の一層の進展が期待される。

引用文献

- 1) <https://bio.nikkeibp.co.jp/atclyb/21/120200163/> 日経バイオ年鑑 発酵乳市場規模
- 2) Ashraf R. and Shah N. P. (2014) Immune system stimulation by probiotic microorganisms, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54, 938–956
- 3) Rodriguez I. J., Ruiz L., Gueimonde M., Margolles A. and Sanchez B. (2013) Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract, *FEMS Microbiol Lett.*, 340, 1–10
- 4) 東幸雅, 伊藤和徳, 佐藤学 (2001) *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, 日本食品科学工学会誌, 48, 656–663
- 5) 中村昇二 (2003) 抗生物質産生乳酸菌およびそれを用いた機能性食品, 公開特許公報 2003–230376
- 6) 多山賢二, 岡本洋子 (2013) 発酵乳製品中のビフィズス菌の生菌数および生存性, 日本食生活学会誌, 24,

118-123

- 7) グリコ乳業 (2011) プロバイオティクス用のビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシーズ・ラクティス菌株及びこれを用いたプロバイオティクス乳酸菌発酵食品又はその他のプロバイオティクス経口食品. 公開特許公報 2011-172506
- 8) Shimizu K, Yamada T, Ogura H, Mohri T, Kiguchi T, Fujimi S, Asahara T, Yamada T and Ojima M. (2018) Ikeda M. and Shimazu T; Synbiotics modulate gut microbiota and reduce enteritis and ventilator-associated pneumonia in patients with sepsis: a randomized controlled trial, *Crit. Care*, 22, 239
- 9) 宮崎歴 (2019) 腸内フローラとこころの関係, 日本調理科学会誌, 52, 276-281
- 10) 日本ルナ ビフィズス菌の消化液耐性 <https://www.nipponluna.co.jp/laboratory/hn019-bifidus.html>
- 11) Amund O. D. (2016) Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria, *Can. J. Microbiol.*, 62, 715-725
- 12) Fukuda S., Toh H., Hase K., Oshima K., Nakanishi Y., Yoshimura K., Tobe T., Clarke J. M., Topping D. L., Suzuki T., Taylor T. D., Itoh K., Kikuchi J., Morita H., Hattori M. and Ohno H. (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate, *Nature*, 469, 543-547

Abstract

Viability of bifidobacteria contained in fermented milk products in model digestive fluids

Tomoka Kurotobi* and Kenji Tayama**

A commercially available yogurt using bifidobacteria that contributes to the normalization of the intestinal microbiota has been put on the market. Bifidobacteria exert their effectiveness by reaching the large intestine in a viable state. However, few experimental data have been reported to compare the viability of different bifidobacteria in digestive and large intestine fluids. Therefore, we purchased commercially available yogurt, and measured the number of viable bifidobacteria contained in it after contact with the model digestive fluid at 37°C. Eight commercial products (7 companies) were purchased as yoghurt. First, it was brought into contact with model gastric juice for 1 hour, then with model small intestinal juice for 22 hours, and the number of remaining viable bacteria was measured. As a result, a significant difference was found between manufacturers, and some products reduced the bacterial count to less than 1/10,000 of the original, while others showed almost no reduction. Next, the artificial model colonic fluid was prepared by adding acetic acid to the diluted bifidobacterium growth medium containing propionic acid, and the 4 excellent yogurt products selected from the above experiment were added to this model fluid and left anaerobically for 24 hours at 37°C. As a result, some products were reduced to about 1/1,000 of the original amount, and some products showed almost no reduction. Although it is not the result of an *in vivo* experiment, it was thought that it would be helpful for us to prioritize when ingesting bifidobacteria in anticipation of the effects of bifidobacteria.

Keywords: intestinal environment, yogurt, bifidobacteria, viability

* Department of Health and Nutrition, Faculty of Health Sciences, Hiroshima Shudo University, 1-1-1 Ozukahigashi, Asaminami-ku, Hiroshima-shi, 731-3195 JAPAN

** Faculty of Regional Development, Prefectural University of Hiroshima, 1-1-71, Ujinahigashi, Minami-ku, Hiroshima-shi, 734-8558 JAPAN