

生菌製剤投与によるラットの脂質代謝

福島 道広¹・中野 益男¹

(受理：1996年5月31日)

Study on Lipid Metabolism in Rats fed a probiotic

Michihiro FUKUSHIMA¹ and Masuo NAKANO¹

摘 要

Bacillus sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Clostridium* sp., *Candida* sp., *Saccharomyces* sp.を米ヌカ上で混合発酵させた生菌製剤をラットに投与することにより、生体内の脂質代謝への影響について検討した。その結果、生菌製剤は糞便中の *E. coli*, *Bacteroidaceae* 等の有害微生物を減少させ、*Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* 等の有用微生物を増加させていた。また、血清中では、生菌製剤が総コレステロール濃度、VLDL+IDL+LDL コレステロール濃度、トリアシルグリセロール濃度および遊離脂肪酸濃度を有意に減少させた。その発現機構として、肝臓中のコレステロール濃度および Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (NADPH) (EC1.1.1.34)活性の低下、Cholesterol 7 α -hydroxylase 活性に変化がみられなかったこと、糞便中への中性ステロール、胆汁酸の排泄増加および *in vitro* における生菌の中性ステロール、胆汁酸に対する吸着能が高いことなどから、コレステロール合成の阻害作用および腸管からのステロールの排泄促進作用が推察された。

キーワード：ラット、生菌製剤、腸内細菌叢、コレステロール、胆汁酸。

緒 言

生菌製剤 (Probiotics) は抗生物質 (Antibiotics) に対比される言葉で、Fuller⁽¹⁾ によって“宿主の腸内細菌叢の共生を改善することにより、宿主にとって有益な作用をもたらす生きた微生物”と定義された。生菌製剤として用いられる細菌は、*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* などのいわゆる乳酸菌群が中心とな

っている。このような各種乳酸菌群が *in vitro* および *in vivo* において多くの病原細菌や腐敗細菌を抑制することが知られている⁽²⁻⁵⁾。また、乳酸菌が生体内において脂質の代謝、とくにコレステロール代謝に影響を及ぼすことが報告されている⁽⁶⁻⁹⁾。

本来、コレステロールは、細胞膜の構成成分として、またステロイドホルモンの前駆物質として生体にとって必須の要素であるが、同時に、その過剰は

¹帯広畜産大学生物資源化学科 〒080 北海道帯広市稲田町

¹Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro Hokkaido 080, Japan.

心筋梗塞や脳血管障害などの基礎病変としての動脈硬化症の一つの発症因子として注目されている。一方、コレステロールの一部は腸内細菌の影響を受け、糞便中へと排泄されている。

近年、高脂血症、糖尿病、動脈硬化症などの成人病の増加が懸念されている。これらの成人病はその原因の多くが食生活などの生活環境にあると考えられることから、腸内細菌との関連について検討することは重要であると思われる。こうした観点から、上記に示したいくつかの微生物とラットのコレステロール代謝との関係が報告されている⁽⁶⁻¹¹⁾。しかしながら、複合系の生菌製剤が腸内細菌叢への共生現象によって、コレステロールの合成および代謝に影響を及ぼす研究については今までに報告されていない。

我々は、動物実験により、腐植土壌から分離した *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Clostridium* sp., *Candida* sp., *Saccharomyces* sp. で構成された生菌製剤が、脂質代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、腸内細菌叢のバランスを正常に維持し、生体での脂質代謝、とくにコレステロール代謝の正常化を促進することを明らかにすることができたので報告する。

実験方法

1) 実験材料

生菌製剤の微生物組成を Table 1 に示す。各微生物は、それぞれ西日本および北日本地域の褐色森林土壌から単離された。*Streptococcus* sp. は KF Streptococcal 寒天培地 (Becton Dickinson Co. Ltd., (BBL) Cockeysville, USA), *Bacillus* sp. は PEES 寒天培地 (栄研化学㈱), 酵母は Potato dextrose 寒天培地を用いて好気条件下で、*Lactobacillus* sp. は *Lactobacillus* 選択培地 (BBL) を用いて嫌気条件下で分離した。次にそれぞれの菌株を Nutrient broth (BBL) および DSM1 broth⁽¹²⁾ の両方を用いて、対数期 (7-14h) まで 37°C で大量振とう培養した。連続遠心により集菌後、リン酸緩衝液で洗浄し、凍結乾燥菌体を調製した。米ヌカ粉体に各分離菌株の凍結乾燥菌体を接種し、無菌室において 38°C、湿度 40-50% で 7 日間発酵させて、生菌数がそれぞれ 10^{7-8} colony-forming units (cfu)/g 米ヌカになるように調整した。

Table 1. Microbial composition of the probiotic*

<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus natto</i>
<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Candida utilis</i>

*Each genus was regulated at 10^7 * cfu/g rice bran, respectively.

2) 実験動物および飼料

4 週齢 Fischer 系雄ラット (F344/Jcl) は日本クレア (株) から購入した。すべてのラットは 12 時間明暗周期、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 条件下で、高コレステロール血症ラットを作成するために、4 週間 20% パーム油および 1% コレステロールを含む高脂肪・高コレステロール食で個別に飼育された (Table 2)。飼料および水は自由摂取とした。ラットの取り扱いには、**Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**⁽¹³⁾ に準じて行った。

Table 2. Composition of semi-purified diet

Component	High fat, high cholesterol diet		Basal diet	
	Probiotic	Control	Probiotic	Control
	(g/kg diet)			
Casein	200	200	250	250
Palm oil	200	200	—	—
Corn oil	—	—	50	50
Vitamin mixture ¹⁾	10	10	10	10
Mineral mixture ²⁾	35	35	35	35
Choline bitartrate	2	2	2	2
DL-methionine	3	3	3	3
Cholesterol	10	10	—	—
Probiotic	150	—	150	—
Rice bran	—	150	—	150
Sucrose to	1000	1000	1000	1000

¹⁾AIN-76 vitamin mixture⁽²⁴⁾

²⁾AIN-76 mineral mixture⁽²⁵⁾

実験は、高脂肪・高コレステロール食群と基準食群に分け(Table 2), 各投与区10匹で生菌製剤を15%添加した食餌を6週間投与した。対照区は米ヌカを15%添加した食餌を与えた。

3) 試料の調製

糞便は投与最終日に24時間以内のものをすべて採取した。血液は絶食させていないラットの頸静脈から毎週採血した。肝臓は最終日に摘出され、氷冷生理食塩水で洗浄後、重量を測定した。

4) 化学分析

血清中の総コレステロール, HDL コレステロール, トリアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸濃度は酵素法にて測定された。

糞便および肝臓中の全脂質は Folch らの方法⁽¹⁴⁾により抽出された。肝臓のホスファチジルコリン(PC)の脂肪酸は Nakano & Fischer の方法⁽¹⁵⁾によりメチル化され, ガスクロマトグラフィー(GLC)により分析された。糞便および肝臓中の中性ステロールはアセチル化後, GLC により分析された。糞便中の胆汁酸は Grundy らの方法⁽¹⁶⁾で測定された。

5) 肝臓ミクロソーム画分の調製

肝臓は氷冷0.25M ショ糖溶液(含 20mM Tris-HCl(pH 7.6), 2mM MgCl₂, 50mM KCl)でホモジナイズされ, 1000×g 10分間遠心分離された。上清は12000×g 15分間遠心分離され, その上清をさらに105000×g 60分間遠心分離して, 得られた顆粒画分をミクロソーム画分とした。ミクロソーム画分は, 1mM EDTA を含む150mM KCl 溶液(pH 7.2)で105000×g 60分間洗浄された。

6) 酵素活性の測定

Hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase (NADPH) (EC1.1.1.34) 活性は Fukushima & Nakano の方法⁽¹⁸⁾を用いて測定された。

Cholesterol 7 α -hydroxylase (EC 1.14.13.17) 活性は Fukushima & Nakano の方法⁽¹⁷⁾を用いて測定された。

7) コレステロールミセル形成の測定

生菌製剤菌体30mg を3mM コレステロール, 30mM 胆汁酸塩, 20mM レシチンの混合液2ml に懸濁した。対照として単一微生物菌体それぞれ *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecalis* および菌体を入れていない混合液を用いた。それぞれの混合液は氷冷

後, 気相を窒素に置換して封をし, 20 kcycles/sec で5分間作用させた後, 37°Cで40時間振とうさせた。混合液はさらに15000×g 30分間遠心分離され, 上清を450nm の吸光度で測定した。

8) 胆汁酸吸着能の測定

生菌製剤菌体30mg をタウロコール酸ナトリウム0.4 mg を含む2ml の200mM リン酸緩衝液(pH6.0)に懸濁した。対照として *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecalis* および菌体を入れていない混合液を用いた。これを37°Cで18時間振とうさせた後, 12000×g 30分間遠心分離により菌体を除去し, 上清画分中のコール酸をアセテート誘導体に調製後, GLC で定量した。

9) 糞便性微生物の培養方法

糞便中の *E. coli* および *Streptococcus* はそれぞれ Desoxycholate 寒天培地および KF Streptococcal 寒天培地を用いて, 37°C 2日間好気培養された。*Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroidaceae*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Mega-shaera* はそれぞれ BS, ES, LBS, NBGT, NN, VS, 変法 VS 寒天培地を用いて37°C 5日間 Gas pack 法により嫌気培養された。

10) 統計処理

データは平均と標準偏差で表し, 血清総コレステロールは area under the curve(AUC)で表した。群間の有意差検定は, Student's t-test および Duncan's multiple-range test により, 5%以下の危険率を有意とした。

実験結果

摂取量, 体重および肝臓重量

ラットの初期体重はそれぞれ, 123.9±16.4g および119.6±19.2g であり, 摂取量は15.2±3.1g および16.2±1.5g であった。投与最終日の両食餌群の体重は, それぞれ230.0±26.2g, 214.7±30.5g であった。体重の増加率および摂取量は, 両食餌群とも生菌製剤投与区と対照区との間に有意な違いはみられなかった。高脂肪・高コレステロール食摂取ラットの肝臓重量は, 生菌製剤投与区で2.17±0.53 g/100 g body weight と対照区の3.35±0.15 g/100g body weight より有意に低い値を示した($p < 0.01$)。基準食摂取ラットでは生菌製剤投与区(1.62±0.59 g/100g

body weight) と対照区 (1.20 ± 0.12 g/100g body weight) との間に有意な差はみられなかった。

組織中の脂質濃度

高脂肪・高コレステロール食群の生菌製剤投与区において、投与期間を通じた AUC は有意に減少していた (Table 3)。しかしながら、基準食群では大きな違いがみられなかった。

Table 3 に投与最終日の HDL および VLDL+IDL+LDL コレステロールの結果を示した。基準食群では、生菌製剤が HDL コレステロール濃度を有意に上昇させた。また、VLDL+IDL+LDL コレステロールは高脂肪・高コレステロール食群および基準食群で、生菌製剤投与により減少させていた。血清中のトリアシルグリセロール濃度および遊離脂肪酸濃度も、また生菌製剤投与により高脂肪・高コレステロール食群で低下させていた。

肝臓中のコレステロール濃度は生菌製剤投与により有意に減少させた。

Table 3. Serum lipid concentrations and liver cholesterol concentration in rats fed on a high-fat, high-cholesterol diet or a basal diet with or without probiotic for 6 weeks

Component	High-fat, high-cholesterol diet		Basal diet	
	Probiotic	Control	Probiotic	Control
Serum (mmol/L)				
Total cholesterol	180.7 ± 7.2^a	215.0 ± 7.8^b	127.0 ± 6.4^a	132.9 ± 6.8^a
HDL-cholesterol	1.3 ± 0.3^c	1.1 ± 0.1^c	1.9 ± 0.1^b	1.7 ± 0.1^b
VLDL+IDL+LDL-cholesterol	2.8 ± 0.2^b	3.8 ± 0.3^a	0.5 ± 0.1^d	1.1 ± 0.2^d
Triacylglycerol	3.2 ± 0.7^b	4.6 ± 0.6^a	2.3 ± 0.5^c	2.2 ± 0.7^c
Free fatty acid	2.4 ± 0.9^b	3.7 ± 0.3^a	1.7 ± 0.6^c	1.8 ± 0.6^c
Liver ($\mu\text{mol/g dry liver}$)				
Cholesterol	51.6 ± 11.0^b	105.5 ± 12.9^a	21.9 ± 2.7^d	27.0 ± 5.3^d

The values are means \pm SD for 10 rats.

^{abc}Values in a row with a different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

Serum total cholesterol values are given as total area under the curve.

Triacylglycerol was calculated as triolein, molecular wt=885.40.

Free fatty acid was calculated as oleic acid, molecular wt=282.47.

肝臓中の脂肪酸組成

Table 4 に肝臓 PC の脂肪酸組成を示す。高脂肪・高コレステロール食群では、生菌製剤投与区でリノール酸が減少、アラキドン酸が増加していた。 $\Delta 6$ -不飽和化酵素活性の指標となるアラキドン酸/リノ

ール酸比は生菌製剤投与区で対照区より有意に増加していたが、基準食群では変化がみられなかった。

肝臓中の HMG-CoA reductase 活性

Table 5 に HMG CoA reductase 活性に対する生菌製剤の影響について示す。酵素活性は、高脂肪・高コレステロール食群で生菌製剤を投与することにより有意に減少していた。基準食群のそれについては変化はみられなかった。

Table 4. Fatty acid composition of the phosphatidylcholine in the livers of rats fed a high-fat, high-cholesterol diet or a basal diet, with or without probiotic, for 6 weeks

Fatty acid	High-fat, high-cholesterol diet		Basal diet	
	Probiotic	Control	Probiotic	Control
	(mol %)			
16:0	22.5 ± 2.0^b	25.9 ± 3.8^a	22.0 ± 1.3^b	22.6 ± 1.4^b
18:0	23.9 ± 1.0^b	22.0 ± 2.8^b	27.0 ± 1.6^a	27.7 ± 0.9^a
18:1	16.9 ± 1.2^a	18.0 ± 2.7^a	9.1 ± 0.6^c	9.4 ± 0.8^c
18:2 _{n-6}	12.2 ± 0.8^c	14.4 ± 2.3^b	9.2 ± 1.3^c	9.5 ± 1.4^c
20:4 _{n-6}	24.6 ± 2.4^a	19.4 ± 3.1^c	32.7 ± 1.4^a	30.0 ± 4.1^a
20:4/18:2	2.04 ± 0.35^b	1.37 ± 0.22^c	2.80 ± 0.41^a	2.56 ± 0.57^a

The values are means \pm SD for 10 rats.

^{abc}Values in a row with a different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

Table 5. HMG-CoA reductase activity in the livers of rats fed a high-fat, high-cholesterol diet or a basal diet, with or without probiotic, for 6 weeks

Probiotic	HMG-CoA reductase activity	
	Microsomal fr. ($\text{dpm/h per mg protein}$)	
High-fat, high-cholesterol diet		
Probiotic	1258 ± 586^c	
Control	4658 ± 722^a	
Basal diet		
Probiotic	2702 ± 282^b	
Control	3006 ± 644^b	

The values are means \pm SD for 10 rats.

^{abc}Values in a column with a different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

肝臓中の Cholesterol 7 α -hydroxylase 活性

Table 6 に Cholesterol 7 α -hydroxylase 活性に対する生菌製剤の影響について示す。酵素活性は、

高脂肪・高コレステロール食摂取ラットおよび基準食摂取ラットともに、対照区と比較して上昇傾向にあったが、有意な差ではなかった。また、ミクロソーム画分中の内因性コレステロール濃度では、上記に示した肝臓中のコレステロール濃度の結果と同様に、生菌製剤を投与することにより減少していることが明らかとなった。とくに、高脂肪・高コレステロール摂取ラットにおいては対照区との間で有意な差が認められた。

Table 6. Cholesterol 7 α -hydroxylase activity in the livers of rats fed a high-fat, high-cholesterol diet or a basal diet, with or without probiotic, for 6 weeks

Probiotic	7 α -hydroxy- 4-cholesten-3-one	4-cholesten- 3-one
	(nmol/h per mg protein)	
High fat, high cholesterol diet		
Probiotic	3.27 \pm 0.93 ^b	693.6 \pm 82.0 ^b
Control	3.01 \pm 1.97 ^a	989.9 \pm 161.5 ^a
Basal diet		
Probiotic	20.86 \pm 8.40 ^b	675.1 \pm 215.6 ^b
Control	14.52 \pm 8.13 ^a	837.9 \pm 293.6 ^{ab}

The values are means \pm SD for 10 rats.

^{ab}Values in a column with a different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

糞便中の脂質濃度

Table 7に糞便中のステロールに対する生菌製剤の影響について示す。生菌製剤は、両食餌群ともコプロスタノールおよびコレステロールを有意に排泄させ、胆汁酸では高脂肪・高コレステロール食群でケノデオキシコール酸およびリトコール酸の排泄を上昇させた。基準食群については変化がみられなかった。

Table 7. Faecal steroid concentrations in rats fed on a high-fat, high-cholesterol diet or a basal diet, with or without probiotic, for 6 weeks

Component	High-fat, high- cholesterol diet		Basal diet	
	Probiotic	Control	Probiotic	Control
(μ mol/rat per d)				
Coprostanol	28.3 \pm 3.4 ^a	10.7 \pm 4.5 ^b	3.32 \pm 1.14 ^c	1.80 \pm 0.45 ^d
Cholesterol	80.1 \pm 12.6 ^a	45.0 \pm 15.2 ^b	3.77 \pm 0.63 ^c	2.94 \pm 0.73 ^d
CA	0.29 \pm 0.20 ^a	0.30 \pm 0.30 ^a	0.07 \pm 0.02 ^b	0.05 \pm 0.02 ^b
DCA	1.18 \pm 0.67 ^a	1.19 \pm 1.05 ^a	0.12 \pm 0.06 ^b	0.09 \pm 0.06 ^b
CDCA	1.43 \pm 0.32 ^a	0.75 \pm 0.31 ^b	0.05 \pm 0.02 ^c	0.06 \pm 0.02 ^c
LCA	2.47 \pm 0.82 ^a	1.29 \pm 0.61 ^b	0.10 \pm 0.03 ^c	0.10 \pm 0.04 ^c

CA, cholic acid; DCA, deoxycholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; LCA, lithocholic acid

The values are means \pm SD for 10 rats.

^{abcd}Values in a row with a different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

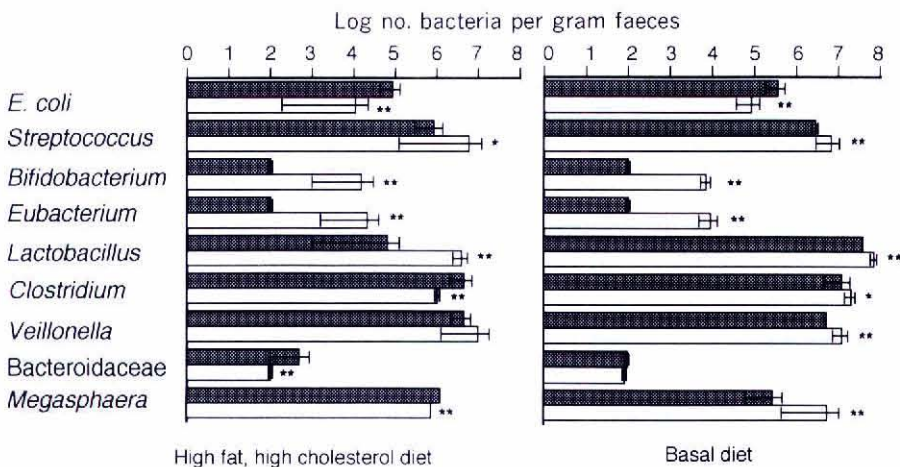


Fig. 1 Composition of the faecal microflora of rats fed on a high-fat, high-cholesterol diet or a basal diet, with or without probiotic, for 6 weeks.

Values are means for ten rats, with standard deviations indicated by bars. Mean values were significantly different from those of controls; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

■ Control □ Probiotic

糞便性微生物叢

Fig. 1 に投与 6 週間後の糞便性微生物叢を示す。両食餌群とも生菌製剤を投与したラットの糞便中に *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* の生菌数が有意な増加傾向にあり, *E. coli* の生菌数が有意な減少傾向にあった。

コレステロールミセル形成および胆汁酸吸着能

各微生物がコレステロールミセル形成および胆汁酸吸着能に及ぼす影響について Table 8 に示す。コレステロール溶解度を示すその透過率は対照で $83.2 \pm 5.7\%$ であるのに対して, 生菌製剤菌体で $67.8 \pm 1.7\%$, *L. acidophilus* で $73.7 \pm 4.8\%$, *S. faecalis* で $74.1 \pm 4.6\%$ と低い値を示していた。その中でもとくに生菌製剤が他の単一微生物と比較して, コレステロールのミセル形成を有意に低下させていた。

各微生物の胆汁酸塩との吸着能についても, 上清画分の菌体と吸着されていないコール酸量を測定した結果, 対照区のコール酸回収率は $79.4 \pm 11.4\%$ (変動係数 $CV=0.14$, $n=6$) であった。生菌製剤, *L. acidophilus* および *S. faecalis* ともに上清画分中のコール酸量は減少していた。その中でもとくに生菌製剤が他の微生物より有意に胆汁酸と吸着していた。

Table 8. Effect of probiotic, *L. acidophilus* and *S. faecalis* on cholesterol micelle formation and bile salt binding *in vitro*

Microorganism	Cholesterol micelle transmittance (%)	Cholic acid (μmol)
Control	83.2 ± 5.7^a	0.78 ± 0.12^a
<i>L. acidophilus</i>	73.7 ± 4.8^b	0.54 ± 0.08^b
<i>S. faecalis</i>	74.1 ± 4.6^b	0.51 ± 0.06^b
Probiotic	67.8 ± 1.7^c	0.25 ± 0.06^c

The values are means \pm SD for 6 samples.

^{a,b,c}Values in a column with a different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

The absorbance was measured at 450 nm to give transmittance (%).

The cholic acid concentration in supernatant was measured by GLC.

Thirty mg of bacterium were added to the buffer, but, not in the control.

考 察

Table 1 に示すように生菌製剤は複合系である。

これらの微生物は個々に生理活性があることが報告されている^(10,18-20)。しかしながら, それぞれ個々の微生物の生理活性よりむしろ, 複合系における腸内での共生現象からの影響の方が強い可能性が考えられる。事実, 生菌製剤は高脂肪・高コレステロール負荷したラットにおいて血清中の総コレステロールおよび VLDL+IDL+LDL コレステロールを有意に低下させていた。また, HDL コレステロールの増加も認められた。これは, 生菌製剤がアポリポ蛋白 B-100 の合成阻害もしくは HDL から VLDL+IDL+LDL へのエステル化を阻害しているのかもしれない。

肝臓重量は生菌製剤投与区で減少しており, 肝臓コレステロールも有意に減少していた。また, 生菌製剤は高脂肪・高コレステロール食群で HGM-CoA reductase 活性を低下させていた。一般的にコレステロールは, この酵素の阻害剤となる。しかし, 今回の成績は対照区に比べて有意にその活性を低下させた結果となった。このことは生菌製剤が, コレステロールを負荷したとき, 肝臓でのコレステロール合成の調整に関与しているのかもしれない。肝臓における $\Delta 6$ -不飽和化酵素活性については, コレステロールを 0.5% 以上負荷したときその活性は低下すると報告されている⁽²¹⁾。脂肪酸組成の調節は膜流動性の変化に依存する。今回の生菌製剤についても, 膜流動性に関与する因子を持っているのかもしれない。

糞便中へのケノデオキシコール酸, リトコール酸, コレステロールおよびコプロスタノールの排泄は高脂肪・高コレステロール食群で増加していた。*Lactobacillus* は胆汁酸やコレステロールとの吸着作用やミセル形成の阻害作用によって, ステロールの糞便中への排泄を増加させるとされている⁽²²⁾。今回用いた生菌製剤は, コレステロールから胆汁酸への律速酵素である Cholesterol 7 α -hydroxylase 活性には影響を示さなかったことや *in vitro* でのコレステロールおよび胆汁酸の吸着能試験の結果からも, 腸管からの胆汁酸の吸収を低下させ, そしてコレステロールミセル吸収に対する阻害作用を示した可能性が高い。糞便中へのコプロスタノールの上昇もまたみられた。コプロスタノールの増加は腸内細菌叢の活性化の指標になるかもしれない⁽²³⁾。我々の成績は腸内細菌叢が活性化していることを示唆した。

Bifidobacterium や *Eubacterium* の変化もまた観

察された。Hoffman は高脂肪食が *Bifidobacterium* の減少を導くことを示している⁽²⁴⁾。しかしながら、今回の実験では、*Bifidobacterium* は生菌製剤投与により 10^4 cfu/g レベルまで上昇した。これは生菌製剤が腸内細菌叢を活性化させているのかもしれない。一般的に、人間では *E. coli* の数が 10^4 cfu/g レベル以上になると病原性が発現するとされている⁽²⁵⁾。今回、*Bifidobacterium* や *Eubacterium* の増加および *E. coli* の減少した理由については不明であった。しかしながら、*Lactobacillus* から分泌される乳酸や生菌製剤の各微生物から分泌される多糖体が腸内細菌叢の組成や代謝を改善している可能性が高い⁽²⁶⁻²⁸⁾。または、*Lactobacillus* や *Clostridium* が *E. coli* を低下させているのかもしれない⁽²⁹⁾。もしくは、生菌製剤中の *Lactobacillus* から誘導される短鎖脂肪酸や抗生物質が病原性および有害微生物を抑制しているのかもしれない^(30,31)。Hitchins & McDonough はヨーグルトバクテリアが *Bifidobacterium* を選択的に増加させ、血清中のコレステロールや中性脂肪を改善することを報告している⁽⁶⁾。

Candida utilis は栄養源であり⁽³²⁾、カンジダ症感染の原因となる *Monilia albicans* は糞便中から検出されなかった。ラットの各臓器の病理組織もまた正常であった。

以上の結果を Fig. 2 にまとめた。複合系の生菌製剤は高脂肪・高コレステロール負荷のとき、ラットの腸内において有用菌である *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 等の乳酸菌や *Streptococcus*, *Eubacterium* の増加および病原性の *E. coli* の減少傾向がみられ、腸内細菌叢全体のバランスが改善されていた (Fig. 2-a)。肝臓においては、腸内で改善された細菌叢および生菌製剤からの産生物のどちらか一方、または両方の影響を受け (Fig. 2-b)、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase 活性が低下していた (Fig. 2-c)。しかしながら、コレステロールから胆汁酸生成への律速酵素である Cholesterol 7 α -hydroxylase 活性には影響はみられなかった (Fig. 2-d)。また、リノール酸不飽和化酵素である $\Delta 6$ -desaturase 活性についても上昇していた。腸内においては、食餌性コレステロール、脱落細胞中のコレステロールおよび胆汁中のコレステロールと胆汁酸が生菌製剤菌体との吸着作用によりミセル形成を阻害しており、コレステロールおよび胆汁酸の糞便中への排泄が増加していた (Fig. 2-e)。また、それに伴い、コレステロールおよび胆汁酸の再吸収が減少している可能性が高い (Fig. 2-f)。その結果、血清および肝臓中でのコレステロール濃度が正常に維持されていることが明らかとなった (Fig. 2-g, h)。一般に、糞便中へのステロールの排泄が促進されるとき、肝臓での HMG-CoA reductase 活性は上昇する傾向にあるが、今回は逆に阻害していた。このことは、生菌製剤の効果は、腸内でのステロールとの吸着と、肝臓でのコレステロール合成を抑制する物質とは別々に作用している可能性が推察された⁽³³⁾。

参考文献

- (1) R. Fuller: *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365-378 (1989).
- (2) N. Kimura, M. Yoshikane, A. Kobayashi, and T. Mitsuoka: *Bifidobacteria Microflora*, **2**, 41-55 (1983).

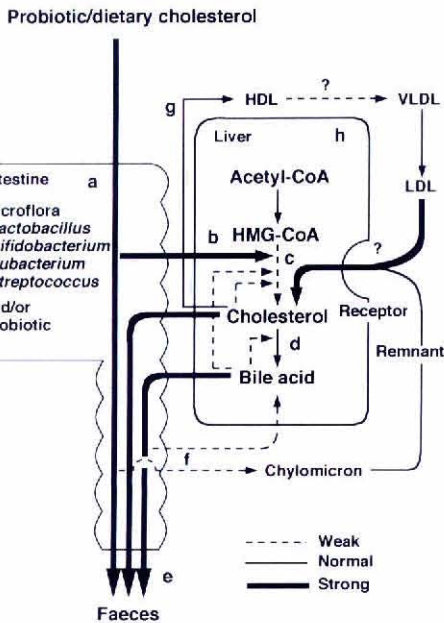


Fig. 2 Postulated modification of cholesterol metabolism in rat liver by probiotic feeding

- (3) C. B. Cole and R. Fuller: *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 495-498 (1984).
- (4) T. Tomoda, Y. Nakano, and T. Kageyama: *Bifidobacteria Microflora*, **7**, 71-74 (1988).
- (5) N. Chateau, I. Castellanos, and A. M. Deschamps: *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 36-40 (1993).
- (6) A. D. Hitchins and F. E. McDonough: *Am. J. Clin. Nutr.*, **49**, 675-684 (1989).
- (7) G. Hepner, R. Fried, S. St. Jeor, L. Fusetti, and R. Morin: *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 19-24 (1979).
- (8) K. K. Grunewald: *J. Food Sci.*, **47**, 2078-2079 (1982).
- (9) 石原一興, 新 良一, 椎名恒子, 山本博一, 磯田政恵: 「腸内フローラと生体ホメオスタシス」, 光岡知足編, 学会出版センター, 東京, 1989, pp. 121-144.
- (10) 鈴木 豊, 海津浩美, 山内吉彦: 日畜会報, **62**, 565-571 (1991).
- (11) G. V. Mann: *Atherosclerosis*, **26**, 335-340 (1977).
- (12) M. Nakano and W. Fischer: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 1439-1453 (1977).
- (13) Committee on Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources Commission of Life Sciences, National Research Council, in "NIH Publication No. 85-23 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", Soft Science Press, Tokyo, Japan, 1986.
- (14) J. Folch, M. Lee, and J. H. Sloane-Stanley: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- (15) S. M. Grundy, E. H. Ahrens Jr., and T. A. Miettinen: *J. Lipid Res.*, **6**, 397-410 (1965).
- (16) M. Fukushima and M. Nakano: *Br. J. Nutr.*, **73**, 701-710 (1995).
- (17) M. Fukushima and M. Nakano: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 860-863 (1995).
- (18) K. Ozawa and H. Yokota: *Jpn. J. Vet. Sci.*, **43**, 771-775 (1981).
- (19) K. Ozawa, K. Yabu Uchi, K. Yamanaka, Y. Yamashita, K. Ueba, and T. Miwatani: *Microbiol. Immunol.*, **23**, 1147-1156 (1979).
- (20) M. Furushiro, H. Sawada, K. Hirai, M. Motoike, H. Sansaw, S. Kobayashi, M. Watanuki, and T. Yokokura: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2193-2198 (1990).
- (21) J. H. Lee, I. Ikeda, and M. Sugano: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**, 389-399 (1991).
- (22) S. E. Gilliland, C. R. Nelson, and C. Maxwell: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 377-381 (1985).
- (23) B. H. Arjmandi, J. Ahn, S. Nathani, and R. D. Reeves: *J. Nutr.*, **122**, 246-253 (1992).
- (24) K. Hoffmann: *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, **192**, 500-508 (1964).
- (25) N. Ishibashi and S. Shimamura: *Food Technol.*, **47**, 126-136 (1993).
- (26) S. E. Gilliland, M. L. Speck, G. F. Nauyok, and F. G. Giesbrecht: *J. Dairy Sci.*, **81**, 1-10 (1978).
- (27) M. Nakano and W. Fischer: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1-11 (1978).
- (28) W. Fischer, R. A. Laine, and M. Nakano: *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 298-308 (1978).
- (29) K. Itoh and R. Freter: *Infection and Immunity*, **57**, 559-565 (1989).
- (30) M. A. Daeschel: *Food Technol.*, **43**, 164-167 (1989).
- (31) S. E. Gilliland and M. L. Speck: *J. Food Prot.*, **42**, 164-167 (1977).
- (32) H. J. Peppler: In "The Yeasts", Vol. 3, eds. by A. H. Rose and J. S. Harrison, Academic Press, London, 1970, pp. 421-462.
- (33) M. Fukushima and M. Nakano: *Br. J. Nutr.*, **76**, in press.
- (34) Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies, *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348 (1977).

SUMMARY

The effect of a probiotic composed of *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Saccharomyces* and *Candida* species (each at 10^7 - 10^8

colony-forming units/g rice bran), given at a level of 150 g/kg diet for 6 weeks, on lipid metabolism was examined in the faeces, serum and liver of male rats. Liver weight decreased 35 % in the rats fed on a high-fat, high-cholesterol diet containing the probiotic. Total cholesterol concentration in the serum was significantly lower in the probiotic group than in the control group throughout the experimental period in rats fed the high-fat, high-cholesterol diet, and HDL-cholesterol concentration was significantly higher ($p < 0.05$) in the probiotic group than in the control group which was fed for 6 week experimental period on a basal diet. The serum VLDL + IDL + IDL-cholesterol concentrations in the probiotic groups were reduced compared with those of the corresponding control groups. The probiotic groups fed on the high-fat, high-cholesterol diet and the basal diet had lower hepatic cholesterol concentrations than did the corresponding control groups ($p < 0.05$). Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (NADPH) (EC1.1.1.34) activity in the liver was lower in rats fed on the high fat, high cholesterol diet with the probiotic. The neutral and acidic steroid concentrations in faeces were higher in the probiotic group than in the control group fed on the high-fat, high-cholesterol diet. *Escherichia coli* decreased and *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Eubacterium* in the faecal microflora of rats fed on the dietary probiotic. *Lactobacillus* in the probiotic groups was higher than that in the control groups. The capacity of the probiotic cells to bind bile salt *in vitro* was significantly higher (approximately 50 %) than that of the single-bacteria cells (*Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis*, $p < 0.05$). On the other hand, cholesterol micelle formation for the probiotic cells was significantly (approximately 9 %) lower than that of the single-bacteria cells ($p < 0.05$). These results indicate that the probiotic promotes *Bifidobacterium* and *Eubacterium* in the faecal microflora,

decreased the synthesis of cholesterol in liver and increased the loss of steroids from intestine, in rats. Thus, the probiotic had a hypocholesterolaemic role.

Key words : Rat, Probiotic, Faecal microflora, Cholesterol, Bile acid.