

## 原著報文

*Lactobacillus brevis* KB290 を含む食品の摂取が  
便秘傾向の健康成人における便通及び  
腸内環境に及ぼす効果の検証  
～無作為化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験～

荒川 千夏<sup>\*,†</sup>, 鈴木 重徳<sup>\*</sup>, 信田 幸大<sup>\*</sup>, 付 茂賓<sup>\*</sup>,  
鈴木 聡<sup>\*\*</sup>, 砂堀 諭<sup>\*</sup>, 菅沼 大行<sup>\*</sup>

(受付日: 2017年9月7日 受理日: 2017年12月18日 オンライン発行日: 2017年12月28日)

*Lactobacillus brevis* KB290 (KB290) を含む食品の摂取が、便通及び腸内環境に及ぼす影響を評価するために、便秘傾向(排便回数: 2~5回/週)の健康成人64名(解析対象者56名(男性19名, 女性37名), 44.9±8.0歳(平均値±標準偏差))を対象に、無作為化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験を実施した。KB290の生菌を $6.0 \times 10^9$  cfu以上含む食品の摂取により、排便回数や便の色、排便後の感覚の有意な改善が対照以上に認められた( $p < 0.05$ )。また、KB290の摂取で、糞便中の*Lactobacillus*属groupの増加( $p < 0.001$ , RT-PCR法)や、酪酸産生菌である*Anaerostipes*属占有率の上昇( $p = 0.002$ , 次世代シーケンス法)が認められた。糞便中のプロピオン酸濃度の変化量がKB290摂取期で有意に高かった( $p = 0.045$ )ことから、本試験で認められたKB290摂取による便通改善作用には、腸内の短鎖脂肪酸の増加が関与していると推測された。

キーワード: *Lactobacillus brevis*, KB290, 便秘, 腸内細菌, 短鎖脂肪酸, プロバイオティクス

Effects of *Lactobacillus brevis* KB290 on bowel movement and on  
intestinal environment in normal healthy volunteers with  
a tendency toward constipation:

A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial

Chinatsu Arakawa<sup>\*,†</sup>, Shigenori Suzuki<sup>\*</sup>, Yukihiro Nobuta<sup>\*</sup>, Maobin Fu<sup>\*</sup>,  
Satoshi Suzuki<sup>\*\*</sup>, Satoshi Sunabori<sup>\*</sup>, Hiroyuki Suganuma<sup>\*</sup>

The aim of this study was to investigate effects of *Lactobacillus brevis* KB290 (KB290) containing beverage (over  $6.0 \times 10^9$  cfu) on bowel movement and on intestinal environment of healthy volunteers with a tendency toward constipation.

A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial was performed in 64 healthy volunteers with 2 to 5 bowel movements per a week (analysis subject number: 56 [19 males, 37 females], 44.9±8.9 years old [average±SD]). Intake of

<sup>†</sup> Corresponding author (E-mail: Chinatsu\_Arakawa@kagome.co.jp)

<sup>\*</sup> Innovation Division, KAGOME CO., LTD., 17 Nishitomiya, Nasushiobara, Tochigi 329-2762, Japan

<sup>\*\*</sup> Shinagawa Season Terrace Health Care Clinic, Shinagawa Season Terrace 5F, 1-2-70 Konan, Minato, Tokyo 108-0075, Japan

<sup>\*</sup> カゴメ株式会社 イノベーション本部 〒329-2762 栃木県那須塩原市西富山17番地

<sup>\*\*</sup> 一般財団法人船員保険会品川シーズンテラス健診クリニック 〒108-0075 東京都港区港南1-2-70 品川シーズンテラス5階

the KB290 beverage for 2 weeks significantly increased the number of days with defecations, and improved stool color and feeling after defecation. Changes in those parameters were significantly larger in the group consuming the KB290 beverage compared with the placebo beverage. Microbiome analysis by RT-PCR method revealed significant increase of *Lactobacillus* group ( $p<0.001$ ) and the changes in fecal propionate was higher in the KB290 beverage ( $p=0.045$ ). Comprehensive microbiome analysis by next generation sequencer method detected significant changes in the ratio of some bacteria such as an increase of *Anaerostipes* ( $p=0.002$ ), a butyrate-producing bacterium.

In conclusion, our results suggest that intake of alive KB290 improves human bowel movements via enhancing short-chain fatty acid production by intestinal microbiota.)

Key words: *Lactobacillus brevis*, KB290, constipation, intestinal microbiota, short-chain fatty acid, probiotics

Journal of Nutritional Food, 16(2), 1–18, 2017

## 1. はじめに

1989年にFullerによってプロバイオティクスの定義がなされ<sup>1)</sup>, 乳酸菌はその代表格として食品への利用が拡大されるとともに, 生体調節機能に関する研究も盛んに行われてきた<sup>2)</sup>. その機能性研究の嚆矢は便秘様症状の改善作用であり, わが国の特定保健用食品(トクホ)制度においても「お腹の調子を整える」等の機能性表示が許可されている. また, トクホに限らず, 種々の保健効果を想起させるプロバイオティクス含有食品が数多く上市されている. さらに近年, 腸内細菌やその代謝物によって構成される腸内環境が宿主の健康と深い関わりを持つことが明らかになりつつあり<sup>3)</sup>, 人の健康の維持・増進におけるプロバイオティクスへの期待感は一層高まってきている.

すでに乳酸菌飲料やサプリメント形態の商品に利用されている *Lactobacillus(L.)brevis* KB290 (2010年に *L. brevis* JCM17312として理研バイオリソースセンターへ寄託; KB290) は, 京都の伝統的な発酵漬物である“すぐき”から分離された乳酸菌であり<sup>4)</sup>, 腸で生きぬく力が強いことが示唆され<sup>5)</sup>, プロバイオティクスとしての有用性が期待される菌株である. これまでに, 便通改善や腸内菌叢改善のほか, 免疫賦活(ナチュラルキラー細胞の活性化, インターフェロン- $\alpha$ 産生能の向上)やインフルエンザ罹患リスクの低減といった様々な機能性や, 食品として摂取することに対する安全性が報告されてきた<sup>4, 6-10)</sup>. 上述の通り, 便通改善は乳酸菌飲料に期待される代表的な機能性であり, KB290についても, 健康成人を対象にした複数の報告が

ある<sup>6)</sup>. すなわち, 便秘傾向の20~65歳の男女を対象に, 21~170億個(21億個, 31億個, 63億個, 170億個)のKB290(生菌)を含むカプセルを摂取させたところ, KB290摂取群はプラセボ群と比べて, 排便回数及び排便日数の変化量が有意に増加した. また, 同じく, 便秘傾向を示す20~65歳の男女を対象に, 平均42億個のKB290(生菌)を含む飲料を摂取させたところ, プラセボ飲料摂取期間と比べてビフィズス菌占有率及び糞便中の酢酸濃度の有意な増加が認められたが, 排便回数及び排便日数についてはプラセボ飲料摂取期間を上回る有意な増加は認められなかった. このように, これまで実施した試験により, KB290が腸内環境の改善を介し, 便通改善効果を発揮することが示唆されたが, 機序も含めた十分な効果の立証には至っていなかった.

そこで今回, KB290の摂取が便通改善効果を示すこと, またその機序として腸内環境の改善を介するか否かを明らかにすることを目的に, 新たに介入試験を行った. 具体的には, KB290の効果を厳密に測定するため, 研究対象者の普段の排便頻度に加えて, 糞便中の *Bifidobacterium* 占有率及びプラセボ効果の現れやすさを事前に調査したうえで, 便秘傾向を示す研究対象者を選定した. KB290の摂取生菌数は, 上記既報の2つの試験結果を総合的に判断して設定した. すなわち, 既報で便通改善効果が認められた最少菌数は1日あたり21億個であるが, 今回の試験目的を踏まえ, 便通と腸内環境との両者について摂取前後で改善効果が認められた42億個を最少目標値として採用し, それに対して試験期間中の菌数担保のための安全率70%を見込んだ60億個を本試験における摂取生菌数とした. な

お、KB290が便通改善効果を発揮する作用機序を考察するために、便通に関する日誌調査とともに、Reverse Transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) 法及び次世代シーケンス法による糞便中細菌叢の解析や、糞便中有機酸濃度の測定を併せて実施した。

## II. 方法

### 1. 試験食品

試験食品は、市場品で使用実績がある原料を用いて、カゴメ株式会社の小牧工場において製造したものを供試した。KB290を含む乳酸菌飲料（130 mL/本、摂取期間中の平均生菌数： $6.0 \times 10^9$  cfu以上/本）を被験食品（原材料：りんご果汁、大豆飲料、乳製品、香料、安定剤（ペクチン）、酸味料）とし、KB290を含まないことを除き、容量や配合、外観や香味が同等である飲料をプラセボ食品とした。なお被験食品及びプラセボ食品の1本当たりの栄養成分は、熱量51 kcal、タンパク質0.3g、脂質0g、炭水化物12.6g、ナトリウム5mgとなるように調製した。KB290の生菌数は、5°Cまたは10°Cに保管した被験食品について、摂取期の開始時、1週間後、2週間後、3週間後のタイミングで、BCP加プレートカウントアガー（NISSUI Pharmaceutical）を用いて測定した。

### 2. 研究対象者

本試験は、「世界医師会ヘルシンキ宣言」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号）」を遵守し、カゴメ株式会社研究倫理審査委員会（受付No. 2016-R06）及び一般財団法人船員保険会品川シーズンテラス健診クリニック試験審査委員会（試験No. KGM-001-02）の承認を受け、臨床試験登録システムであるUMIN-CTRに登録した後に実施した（発行ID. UMIN000024691）。研究対象者の募集は、開発業務受託機関である株式会社ケイ・エス・オーが行い、試験参加希望者には試験分担医師及び試験コーディネーターより本試験の主旨を十分に説明したうえで、試験責任医師が自由意思による

同意を文書で得た。

研究対象者は、20歳以上60歳未満の健康な日本人男女の中から、選定基準あるいは除外基準を満たす者とした。選定基準は（1）排便回数が2～5回/週の者、（2）毎日の食事を規則正しく摂取している者（通常1日3食）、（3）糞便中のビフィズス菌の占有率が低い者、（4）試験の目的・内容について十分な説明を受け、同意能力があり、よく理解したうえで自発的に参加を希望し、書面で本試験参加に同意した者とし、また、除外基準は①整腸剤や便秘薬（下剤、浣腸を含む）を常用している者、②試験期間中に乳酸菌・ビフィズス菌・納豆菌等の生菌類含有食品、オリゴ糖・食物繊維を強化した食品、便秘改善によいとされる健康食品類（特定保健用食品を含む）、及び糖アルコール多量含有食品の摂取を止めることができない者、③アルコールを、「ビール中瓶」換算で1日に2本より多く常飲している者、④抗生物質等、消化吸収に影響を与える薬剤を服用している者、⑤食品のアレルギーを有する者、⑥妊娠している者、試験期間中妊娠の意思がある者、授乳中の者、⑦他の食品の摂取や薬剤を使用する試験、化粧品及び薬剤等を塗布する試験に参加中の者、参加の意思がある者、⑧緊急に治療を要する疾患に罹患している者、又は重篤な合併症を有する者、⑨消化吸収や排便に影響を与える消化器疾患、又は手術歴がある者（虫垂切除を除く）、⑩薬物依存、アルコール依存の既往歴あるいは現病歴がある者、⑪過敏性腸症候群（IBS）や炎症性腸疾患（IBD）と診断されたことがある者、⑫生理の周期が毎回大きく変わる者、更年期障害の治療を受けている者、⑬研究対象者調査票の回答から研究対象者として不適当であると判断された者、⑭その他、試験責任医師が研究対象者として不適当と判断した者とした。さらに、試験期間中の制限事項はa) 試験以前と同様の生活（食事、運動、睡眠）を維持するようにし、不規則な生活は避ける（暴飲・暴食、ダイエット、海外旅行等での食生活の大幅な変更、今までしていた運動を急にやめる、新しく運動を始める等はない）、b) 整腸剤・便秘薬等便秘改善に影響を及ぼす可能性がある医薬品の使用を避ける、c) 乳酸



菌・ビフィズス菌・納豆菌等の生菌類含有食品，オリゴ糖・食物繊維を強化した食品，便秘改善によいとされる健康食品類，糖アルコール多量含有食品の摂取を避ける，d) 多量のアルコール摂取を避ける（1日最大量：ビール中瓶2本相当まで），e) 他の食品の摂取や薬剤を使用する試験，化粧品及び薬剤等を塗布する試験に参加しない，f) 試験期間中，医薬品は緊急の場合を除いて，試験責任医師または試験分担医師の許可を得て使用する。使用した場合は，使用理由，使用医薬品名，使用量，使用期間等を研究対象者日誌に記載し，来院時に試験責任医師または試験分担医師に報告するとし，これらを遵守するように研究対象者を指導した。

### 3. 試験スケジュール

本試験は，2017年3月18日～2017年6月16日の13週間の間，観察期（2週間），摂取I期（3週間），休止期（5週間），摂取II期（3週間）の4期間からなる，無作為化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験のデザインで実施した（Fig. 1）。試験開始に先立ち，研究対象者の選定のために，2段階のスクリーニングを行った。スクリーニングIでは，研究対象者候補の健康状態や生活背景，普段の排便頻度等を調査するため，研究対象者調査票及び問診，研究対象者日誌及び食事日誌を記入させるとともに，糞便中の*Bifidobacterium*占有率を調査するために，スクリーニング期間に排便さ

れた糞便の一部を一回，部分的に採便させた。選定基準(1)及び(2)を満たし，かつ除外基準に抵触しない者の中から，選定基準(3)に従い，糞便中の*Bifidobacterium*占有率が低い者から優先して133名を選定した。さらに，スクリーニングIIではプラセボ食品を2週間継続摂取させ，研究対象者日誌及び食事日誌による調査を実施した。そして，スクリーニングII（プラセボ食品摂取開始後1週目または2週目）において，排便回数が1回以下または6回以上の者をまず除外し，さらに，スクリーニングIで調査した普段の排便回数からの変化量が少なく糞便中の*Bifidobacterium*占有率が低い者から優先して目標組み入れ数である66名に達するよう選定した。この66名を，無作為に2つの群に割付け，一方をプラセボ食品先行摂取群，もう一方を被験食品先行摂取群とした。無作為化は，試験に直接関与しない株式会社ケイ・エス・オーの割付責任者が性別及び1週間当たりの排便回数を層別因子とした層別置換ブロック法（ブロックサイズ4）により行った。試験食品とその識別記号（XまたはY）との割付表は，カゴメ株式会社の試験食品管理者が作成して密封し，それをカゴメ株式会社及び株式会社ケイ・エス・オーとは別の第3者の割付責任者が，研究対象者と試験食品との割付表とともに管理した。両割付表ともに，試験終了後にデータを固定し解析対象者を選定した後に開封した。摂取期間中は，いずれかの試験食品を1日1本摂取させ，研究対象者

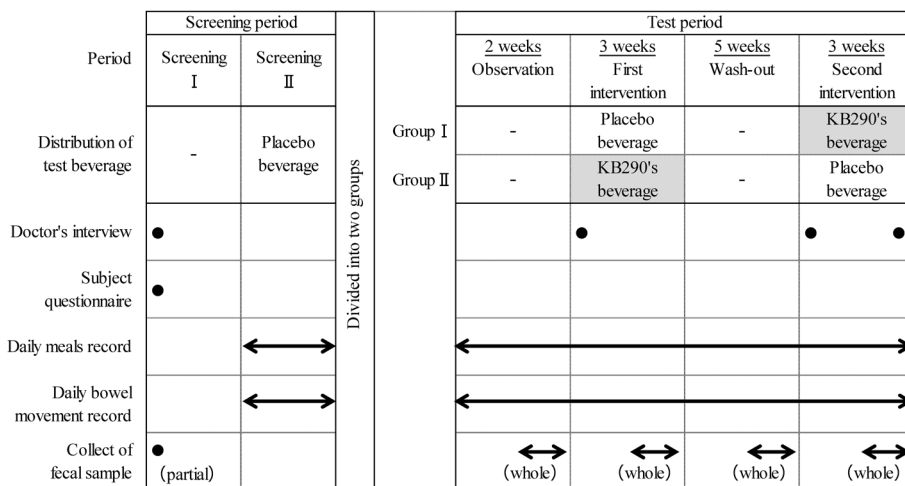


Fig. 1 Test schedule

日誌及び食事日誌を毎日記録させた。各期間の最終日の2~6日前を採便期間とし、この期間内の排便のうち任意の1回を全量採便させた。

#### 4. 日誌調査項目

##### 1) 研究対象者調査票

研究対象者調査票では、既往歴及び服用薬、食物アレルギーの有無、生活習慣（食事回数、飲酒習慣、喫煙習慣、乳酸菌飲料・健康食品・サプリメント・栄養ドリンク等の摂取習慣、普段の排便頻度）、女性には上記に加えて生理周期に関する質問に回答させた。

##### 2) 研究対象者日誌

研究対象者日誌では、排便状況（排便の回数及び日数、時刻、量）、便性状（便形状、便の色、便の臭い）、排便後の感覚、生理の有無（女性のみ）、胃腸症状を中心に体調変化の有無、整腸剤・便秘薬使用の有無、医薬品や市販薬の服用の有無、生活・環境の変化等を調査した。摂取期間中には、試験食品の摂取の有無と摂取時刻も記録させた。排便量は、研究対象者が目視で、鶏卵Mサイズの見本と比較して、小数点第一位までの個数に換算した値を記録させた。便形状は見本図を渡し、①コロコロ状、②カチカチ状、③バナナ状、④半練状、⑤泥状、⑥水状の6段階で記録させた。便の色は色調見本（カラーガイド第17版；DIC Graphics）を渡し、①黄褐色（DIC240）、②茶褐色（DIC308）、③黒褐色（DIC311）の3段階で最も近いと思われる色を記録させた。便の臭いは、①全く気にならない、②ほとんど気にならない、③普通、④臭い、⑤とても臭い、の5段階で記録させた。排便後の感覚は、①スッキリ感がある、②普通、③残便感がある、の3段階で記録させた。

##### 3) 食事日誌及び栄養調査

試験期間中、毎回の食事内容（食事の時間と場所、料理名とその量）を記録させた。食事の記録内容を基に、栄養管理ソフト（エクセル栄養君Ver. 8; KENPAKUSHA）を用いて、摂取期における各採便期間の前日から終了日までのカロリー、水分、食物繊維の摂取総量を算出した。

#### 5. 糞便中の細菌叢解析及び有機酸濃度の測定

##### 1) 糞便試料

採取した糞便は、保冷剤を用いて冷蔵状態を保ち、48時間以内に分取及び保存処理を行った。すなわち、全量を採取した糞便は滅菌薬匙で十分均質化後、RT-PCR用のRNA抽出及び有機酸濃度測定のために、滅菌2mL容マイクロチューブに容器容量の8割程度を、また、次世代シーケンス用のDNA抽出のために採便容器（RINSYOJUSHIKAGAKU）に約0.5gを分取した。RT-PCR及び有機酸濃度測定用に分取した試料は直ちに次の工程を行い、次世代シーケンス用に分取したものは、ドライアイスヘキサン下（ヘキサン中にドライアイスを入れたおよそ $-79^{\circ}\text{C}$ の液中）で急速凍結後、ドライアイス下で分析機関へ輸送し、次工程を行うまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。RT-PCR法及び有機酸濃度は株式会社ケイ・エス・オーから株式会社 栄養・病理学研究所に分析を委託し、次世代シーケンス法による解析はカゴメ株式会社において実施した。

##### 2) RT-PCR法による *Bifidobacterium* 属 及び *Lactobacillus* 属 group の菌数測定

糞便からのRNA抽出は、QuickGene-810 system及びQuickGene RNA tissue kit SII（いずれもKURABO）を用いて行った。滅菌2mL容コニカルチューブに15mgを採り、Lysis Buffer（あらかじめ、キット付属のLRT 1mLあたり2-メルカプトエタノールを $10\mu\text{L}$ 添加）を加え、ビーズ式細胞破碎装置（Micro-Smash MS-100; TOMY SEIKO）で $3,000\text{rpm}\times 120\text{sec}$ を2回繰り返して破碎処理を行った。それを遠心分離（ $17,000\times g$ , 3min, 室温）し、上清 $350\mu\text{L}$ を新しい滅菌1.5mL容マイクロチューブに採取した。これにキット付属のSolubilization Buffer（SRT）を $175\mu\text{L}$ 加え、ボルテックスで15sec攪拌後、フラッシュ遠心した。さらに99.5%特級エタノールを加え、ボルテックスで60sec攪拌後、フラッシュ遠心し、QuickGene-810 system及びキット付属のフィルターを用いて精製した。精製には、DNase（20 unit/sample; Roche Diagnostics/NIPPON Genetics）を添加しDNA

を消化させる工程を含めた。RNA抽出液は、超微量分光光度計 (NanoDrop ; NanoDrop Technologies) を用いてRNA濃度を測定した。

逆転写反応は、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time; TAKARA Bio) を用いて行った。この際、プライマーはキット付属のRandom 6 merを用いた。

リアルタイムPCRは、リアルタイムPCRシステム (RoterGene 6200; Qiagen) を用いて行った。 *Bifidobacterium* 属, *Lactobacillus* 属 group及び総菌数測定用のプライマー名, 塩基配列, 並びにPCR条件をTable 1に示した。SYBR Premix Ex taq II (TAKARA Bio) を5 $\mu$ L, 10 $\mu$ Mのプライマーを0.2 $\mu$ Lずつ, 滅菌蒸留水3.6 $\mu$ L, cDNA溶液1 $\mu$ L, 総量10 $\mu$ Lの反応液を調製し, RoterGene専用チューブに入れて反応させた。総菌数及び *Bifidobacterium* 属菌数測定用には, *Bifidobacterium longum* JCM1217<sup>T</sup>を, *Lactobacillus* 属 group 菌数測定には, *Lactobacillus brevis* JCM1059<sup>T</sup>を用いて, 同様に調製したcDNA溶液を用いて検量線を作成し, Ct値を基に目的の菌数を算出した。総菌数に対する *Bifidobacterim* 属菌数の比率 (%) を *Bifidobacterium* 占有率とした<sup>11-13)</sup>。

3) 次世代シーケンス法による糞便中細菌叢の解析  
 冷凍された糞便が入った採便管を氷上に静置し, 解凍した。解凍後, 採便管の内容物を5mL容チューブに0.1g程度採り, リン酸緩衝液 (pH 7.4, PBS; Gibco/Thermo Fisher Scientific) を1mL加え, ボルテックスにより分散させた後, 50mL容チューブにセットしたポアサイズ100 $\mu$ mのセルストレーナー (Corning Life Sciences) にて残渣を除去した。元の5mL容チューブに新しいPBSを1mL加えて攪拌した液を, 上記セルストレーナーに通す操作を2回繰り返した。ろ液すべてを15mL容チューブに移し, 遠心分離 (5,000 $\times$ g, 10min, 4 $^{\circ}$ C) 後, 上清を除去した。この沈殿物にPBSを1mL加えて懸濁した。この懸濁液150 $\mu$ Lを, 0.1mmのジルコニアビーズ (YASUI KIKAI) 0.3gをあらかじめ入れた2mL容ビーズショッカー用チューブ (YASUI KIKAI) に採り, Proteinase K溶液 (20mg/mL, TAKARA Bio) 15 $\mu$ L, Bacteria Lysis Buffer溶液 (Roche Diagnostics/NIPPON Genetics) 135 $\mu$ Lを加えた。この混合液をビーズショッカー MSH003(S) (YASUI KIKAI) にセットし, 2,500rpm, 3minのビーズ破碎処理を行った。これを静置後, 液相100 $\mu$ Lをサンプルチューブ (MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I付属, Roche Diagnostics/NIPPON Genetics) に採取し, 65 $^{\circ}$ Cで10min反応後, 95 $^{\circ}$ Cへ昇

Table 1 Reaction condition performed in reverse transcription quantitative PCR

Target	Primer	Sequence	Cycle condition		
			Denaturing	Annealing	Extension
<i>Bifidobacterium</i> genus	Bifidobacterium sp.-F	5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACGC-3'	95 $^{\circ}$ C, 15s	60 $^{\circ}$ C, 20s	—
	Bifidobacterium sp.-R	5'-CTGATAGGACGCGACCCCAT-3'			
<i>Lactobacillus</i> group*	Lactobacillus group-F	5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'	95 $^{\circ}$ C, 20s	58 $^{\circ}$ C, 30s	72 $^{\circ}$ C, 30s
	Lactobacillus group-R	5'-CACCGCTACACATGGAG-3'			
Total bacteria	All bacteria-F	5'-CGGYCCAGACTCCTACGGG-3' (Y=C or T)	95 $^{\circ}$ C, 20s	63 $^{\circ}$ C, 30s	72 $^{\circ}$ C, 45s
	All bacteria-R	5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'			

\*Target includes *Lactobacillus* (*L.*) *acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. amylolyticus*, *L. acetotolerans*, *L. crispatus*, *L. amylophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. mucosae*, *L. vaginalis*, *L. panis*, *L. oris*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. collinoides*, *L. alimentarius*, *L. farciminis*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. kefir*, *L. fructivorans*, *L. mali*, *L. animalis*, *L. murinus*, *L. ruminis*, *L. agilis*, *L. salivarius* ssp. *salicinius*, *L. aviarius* ssp. *aviarius*, *L. sharpeae*, *L. manihotivorans*, *L. rhamnosus*, *L. casei* ssp. *casei*, *L. zaeae*, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. paracasei* ssp. *tolerans*, *L. coryniformis* ssp. *coryniformis*, *L. bifementans*, *L. perolens*, *L. sakei* ssp. *sakei*, *L. casei* ssp. *fusiformis*, *Pediococcus* (*P.*) *pentosaceus*, *P. parvulus*, *P. acidilactici*, *P. dextrinicus*, *Weissella* (*W.*) *halotolerans*, *W. confusus*, *W. paramesenteroides*, *W. hellenica*, *W. viridescens*, *W. kandleri*, *W. minor*, *Leuconostoc lactis*.



温し、そのまま5minの加熱処理を行った後に氷冷した。これにPBSを300 $\mu$ L加えて全自動核酸精製装置 (MagNa Pure Compact; Roche Diagnostics) に供し、Protocol: DNA\_Bacteria、溶出量: 50 $\mu$ Lの設定において、DNA抽出を行った。

このDNA抽出液をテンプレートとして、Illumina社が提供する16Sメタゲノム用のライブラリー調製プロトコルに従い<sup>14)</sup>、シーケンシングライブラリーを調製した。16S rDNA増幅のためのユニバーサルプライマーには、V1-2領域がターゲットである【Forward primer: 5'-agrgtttgatymtggctcag-3', Reverse primer: 5'-tgctgctcccgtaggagt-3'】(DNAオリゴの合成はIntegrated DNA Technologiesへ委託)を用いた。Amplicon PCRは、鋳型DNA (5ng/ $\mu$ L) 2.5 $\mu$ L, 各プライマー (1 $\mu$ M) 5 $\mu$ Lずつ, 2 $\times$ KAPA HiFi HotStart Ready Mix (KAPA Biosystems/NIPPON Genetics) 12.5 $\mu$ Lを混合し、サーマルサイクラ— (Bio-Rad Laboratories) を用いて、95°C 3min, 95°C 30sec $\rightarrow$ 55°C 30sec $\rightarrow$ 72°C 30secを25サイクル, 72°C 5minの条件で反応させた。Amplicon PCR産物をAMPure XP beads (Beckman Coulter) により精製し、Index PCRの鋳型DNAとした。Index PCRは、鋳型DNA 5 $\mu$ L, Nextera NX Index Primer (Illumina) は任意の組み合わせ2種類を各5 $\mu$ Lずつ, 2 $\times$ KAPA HiFi HotStart Ready Mix (KAPA Biosystems/NIPPON Genetics) 25 $\mu$ L, Milli-Q水10 $\mu$ Lを混合し、サーマルサイクラ— (Bio-Rad Laboratories) を用いて、95°C 3min, 95°C 30sec $\rightarrow$ 55°C 30sec $\rightarrow$ 72°C 30secを8サイクル, 72°C 5minの条件で反応させた。Index PCR産物をAMPure XP beads (Beckman Coulter) により精製し、KAPA Library Quantification Kits Illumina/Universal (KAPA Biosystems/NIPPON Genetics) を用いて定量した。Index PCR精製物をMilli-Q水で4nMに希釈し、各サンプル5 $\mu$ Lずつを1本のマイクロチューブに回収し、シーケンスに用いるDNAライブラリーとした。DNAライブラリー (4nM) 5 $\mu$ Lと0.2N NaOH 5 $\mu$ Lを混合後、室温で5minインキュベートして変性させた。変性DNAと同様に変性処理したPhix Control v3 (Illumina), Pre-chilled HT1

(MiSeq Reagent Kits v3 (600Cycle); Illuminaに付属)を終濃度4~20 pMの濃度で混合し、シーケンシングに供した。シーケンシングは (MiSeq Reagent Kits v3 (600Cycle); Illumina) 及び次世代シーケンサー (MiSeq; Illumina) を用いて行い、得られた16S rDNA配列のうち、5,000リード/サンプルを抽出して、糞便中細菌叢の解析を行った。OTU (Operational Taxonomic Unit) の作成、BLAST検索による菌種帰属は、東京大学大学院新領域創成科学研究科オーミクス情報センターの解析パイプライン<sup>15, 16)</sup> (データベース2015年1月作成) に従って実施した。

#### 4) 有機酸濃度の測定

前処理及び分析方法は既報<sup>17)</sup>に準拠した。1.5mL容マイクロチューブに0.3gの糞便を分取し、蒸留水を0.6mL加えて懸濁し、12%過塩素酸を90 $\mu$ L加えて懸濁した。その後、遠心分離 (15,000 $\times$ g, 10min, 4°C) を行い、タンパク質を沈澱させた後、次の処理を行うまで、-80°Cで凍結保存した。凍結保存した1.5mL容マイクロチューブ内の糞便上清を0.45 $\mu$ mの水系フィルター (コスモナイスフィルター W; NACALAI TESQUE) で濾過し、減圧下で抜気して炭酸ガスを除去し、5 $\mu$ Lを有機酸濃度の測定に供した。

有機酸濃度の測定は、イオン排除クロマトグラフィー<sup>17)</sup>を用いて行った。すなわち、送液ポンプ (LC-10ADポンプ; SHIMAZU) と電気伝導度計 (Waters 431; Waters), 有機酸分析カラム (Waters Organic Acid Column 7.8mm $\times$ 30cm $\times$ 2本; Waters), カラムヒーターモジュール及びコントローラーからなるシステムで、移動相には5mM *p*-トルエンスルホン酸を、ポストカラム反応相には5mM *p*-トルエンスルホン酸, 20mM Bis-Tris, 100 $\mu$ M EDTA (free acid) を用い、カラム温度45°C, 流速0.8mL/minとした。電気伝導計のベース電圧は2,000mV, 感度0.01として、成分の同定にはCBM-20Aデータモジュール (SHIMAZU) を用い、コハク酸, 乳酸, ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, *n*-酪酸, イソ吉草酸, *n*-吉草酸を検出した。

## 6. 統計処理

研究対象者の背景データは対応のある  $t$  検定（有意水準5%，両側検定）を行った。栄養データは対応のある  $t$  検定（有意水準5%，両側検定）を行った。時期効果及び順序効果，試験食品効果を，一般化線形モデル（GLM）により検証した<sup>18)</sup>。

排便回数，排便日数及び排便量は，摂取期（摂取I期，摂取II期）の1週目と2週目の平均値，及び直前の非摂取期（観察期2週間，休止期の4週目と5週目）の平均値を基に，各変化量を算出した。その変化量の値を用いて，排便回数及び排便日数については被験食品摂取期とプラセボ食品摂取期との有意差検定を，対応のある  $t$  検定（有意水準5%，片側検定）により行い，試験食品摂取前後の比較を，反復測定分散分析（Holmの多重比較）により行った。また，排便量については試験食品間の比較を，Wilcoxonの符号付順位検定（有意水準5%，片側検定）により行い，試験食品摂取前後の比較を，Friedman検定（Holmの多重比較）により行った。

便性状（便形状・便の色・便の臭い）及び排便後の感覚は，スコアを排便があった回数で平均化した値を用いて，上述と同様に変化量を算出し，被験食品摂取期とプラセボ食品摂取期との有意差検定を，Wilcoxonの符号付順位検定（有意水準5%）により行った。便形状は両側検定を，便の色，便の臭い及び排便後の感覚は片側検定を実施した。また，便性状及び排便後の感覚スコアの試験食品摂取前後比較を，Friedman検定（Holmの多重比較）により行った。

糞便中の *Bifidobacterium* 占有率，その他の菌群の比率，及び有機酸濃度は，摂取期（摂取I期又は摂取II期の3週目）と直前の非摂取期（観察期の2週目又は休止期の5週目）の値を元に変化量を算出し，被験食品摂取期とプラセボ食品摂取期との有意差検定を，対応のある  $t$  検定（有意水準5%，両側検定）により行った。

すべての統計処理はEZR（R version 3.1.1, R commander version 1.26）ソフトウェア<sup>19)</sup>にて実施した。

## 7. 有害事象の判定

問診及び研究対象者の申し出に基づき，試験期間中に発生した有害事象を収集し，試験食品との関連性の有無を試験責任医師が判定した。

## III. 結果

### 1. 試験食品

摂取期間中の被験食品に含まれるKB290の生菌数は，測定したサンプルすべてにおいて，規格である  $6.0 \times 10^9$  cfu以上/本を満たしていた。

### 2. 研究対象者の背景

研究対象者に選定した66名のうち試験不参加の2名を除き，64名を最大解析対象集団（FAS: Full Analysis Set）とした。このうち，8名（試験期間中に抗生物質を含む処方薬を服用した1名，市販薬を多用した2名，禁止食品を多量摂取した2名，下痢と腹痛が高発現した1名，そして日誌内容に信頼性を欠く2名）を除外し，残り56名（男性19名，女性37名，平均年齢  $44.9 \pm 8.0$  歳，平均BMI  $21.6 \pm 2.8$ ，1週間当たりの排便回数  $3.7 \pm 0.9$  回）を，有効性評価のための解析対象者集団（PPS: Per Protocol Set）とした（Fig. 2）。

解析対象者の性別構成，試験開始前の年齢，BMI，1週間当たりの排便回数において，2群間に差は認められなかった（Table 2）。

糞便試料を用いた糞便中細菌叢の解析及び有機酸濃度の測定では，採便後48時間を超えるデータを含むものは欠損として扱い， $n=52$ で解析した。さらに，次世代シーケンス解析においては，シーケンスリード数5,000に満たないデータは欠損とし， $n=51$ で解析した。

なお，試験食品摂取期のエネルギー，水分及び食物繊維の摂取総量を，摂取期の採便期間中の栄養調査を基に比較した結果，プラセボ食品摂取期と被験食品摂取期との間に有意な差は認められなかった（データ示さず）。

### 3. 排便回数及び排便日数（主評価項目）

試験期間中の排便回数及び排便日数について，時



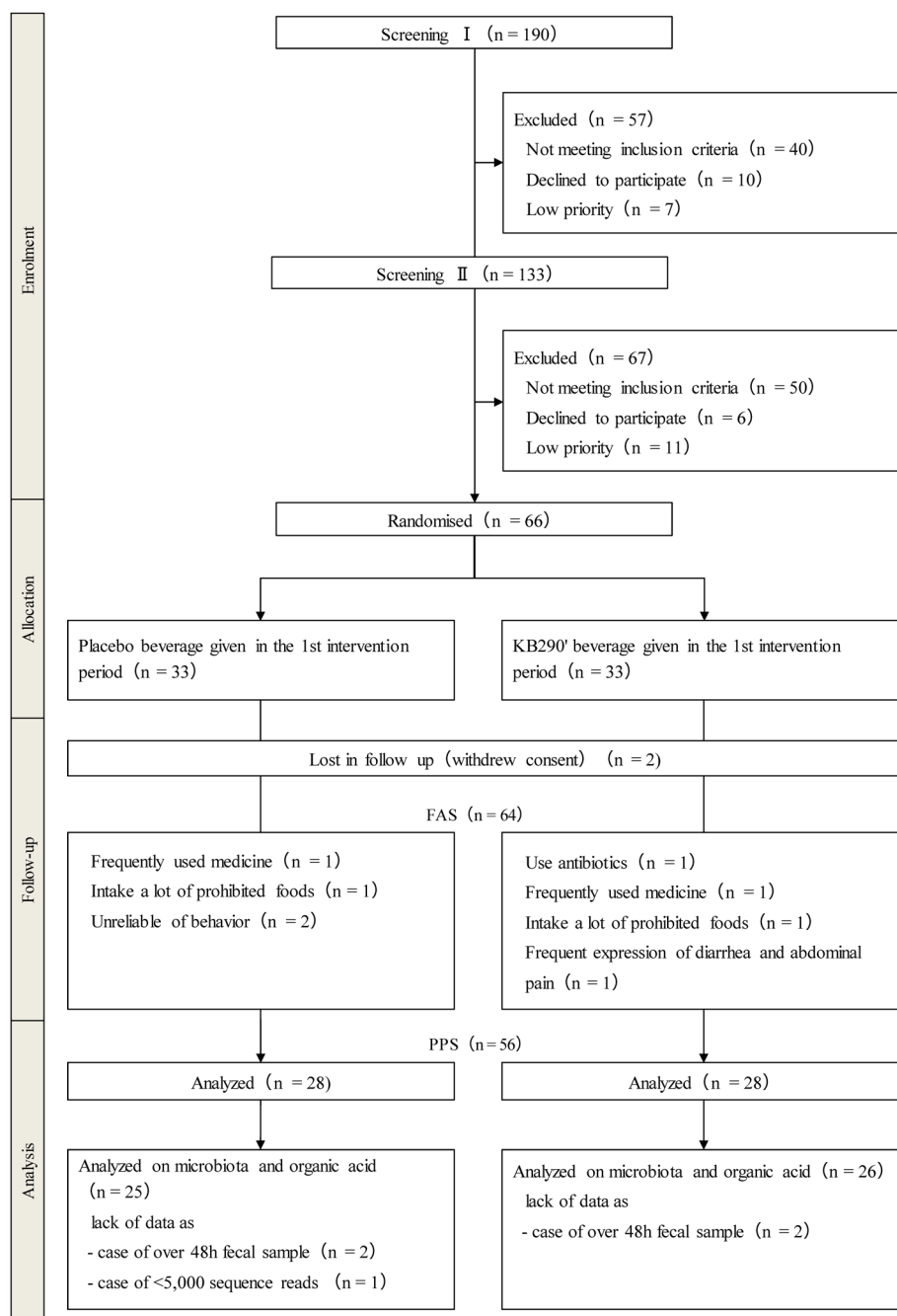


Fig. 2 Flow diagram of participant through the trial

Table 2 Clinical background of subjects

Background	FAS			PPS		
	Total (n = 64)	Group of Placebo beverage in 1st (n = 32)	Group of KB290's beverage in 1st (n = 32)	Total (n = 56)	Group of Placebo beverage in 1st (n = 28)	Group of KB290's beverage in 1st (n = 28)
Male:Female (number)	19:45	9:23	10:22	19:37	9:19	10:18
Age (years)	44.0±8.6	43.8±9.4	44.2±7.9	44.9±8.0	44.2±9.2	45.6±6.7
Body Mass Index (BMI)*	21.6±2.8	21.6±2.5	21.6±3.2	21.6±2.8	21.3±2.4	22.0±3.1
Ordinary defecation frequency per a week	3.7±0.9	3.7±0.9	3.7±0.9	3.7±0.9	3.8±0.9	3.6±0.9

Average±SD

\*Body weight (kg)÷Height (m)÷Height (m)

Table 3 Primary outcomes: change of defecation frequency and days of defecation per a week before and after intervention of trial beverages

Outcome	Period	Observed value		Amount of change		Compared with before intervention* <sup>1</sup> (p value)	Compared between each beverages* <sup>2</sup> (p value)
		Average±SD	Median	Average±SD	Median		
Defecation frequency (/week)	Placebo beverage	before	4.0±1.1	4.0	0.19±0.93	0.25	0.135
		after	4.2±1.3	4.0			
	KB290's beverage	before	4.1±1.4	4.0	0.38±1.09	0.50	
		after	4.4±1.5	4.5			
Days of defecation (/week)	Placebo beverage	before	3.7±1.0	3.5	0.16±0.75	0.00	0.044
		after	3.9±1.1	4.0			
	KB290's beverage	before	3.7±1.1	3.5	0.44±0.90	0.50	
		after	4.1±1.3	4.0			

n = 56

\*1 Repeated measures analysis (Multiple comparisons by Holm's method).

\*2 Paired t-test (one-sided test).

期効果及び順序効果，試験食品効果を解析した結果，順序効果，時期効果はいずれも有意ではなく，試験食品効果が有意であった。

排便回数及び排便日数の調査結果を Table 3 に示した。排便回数の変化量は，プラセボ食品摂取期 (0.19±0.93 回/週) と被験食品摂取期 (0.38±1.09 回/週) との間に有意差は認められなかった。排便日数の変化量は，プラセボ食品摂取期 (0.16±0.75 日/週) に対して，被験食品摂取期 (0.44±0.90 日/週) のほうが高値を示し，有意な増加が認められた ( $p=0.044$ )。

#### 4. 排便量及び便性状，排便後の感覚（副次評価項目）

排便量及び便性状，排便後の感覚の調査結果を Table 4 に示した。排便量，便形状，便の臭いのスコア変化量は，プラセボ食品摂取期と被験食品摂取期との間に有意差は認められなかった。便の色のスコア変化量は，プラセボ食品摂取期 -0.01±0.15 に対して，被験食品摂取期 -0.12±0.20 であり，“褐色・黄褐色”側に有意に改善することが確認された ( $p=0.002$ )。排便後の感覚スコア変化量は，プラセボ食品摂取期 -0.05±0.22 に対して，被験食品摂取期 -0.11±0.23 であり，“普通・スッキリ感があ

る”側に有意に改善した ( $p=0.044$ )。

#### 5. 糞便中細菌叢（副次評価項目）

##### 1) RT-PCR 法

RT-PCR 法による測定結果を Table 5 に示した。総菌数の変化量に有意差が認められ，被験食品摂取期と比べてプラセボ食品摂取期のほうが高値を示した。*Lactobacillus* 属 group の菌数の増加量は，プラセボ食品摂取期と比べて被験食品摂取期のほうが有意に大きかった ( $p<0.001$ )。*Bifidobacterium* 属の菌数及び占有率について，試験食品間に有意差は認められなかった。

##### 2) 次世代シーケンス法

次世代シーケンス法により測定した主な菌種の変化を Table 6 に示した。科レベルでは，*Catabacteriaceae* 科のリード数がプラセボ食品摂取期でやや上昇したのに対して被験食品摂取期ではやや低下し，その変化量の比較で有意差が認められた ( $p=0.035$ )。また，*Ruminococcaceae* 科はプラセボ食品摂取期で増加したのに対し，被験食品摂取期では変化が認められず，変化量に差がある傾向が認められた ( $p=0.055$ )。属・種レベルでは，被験食品摂取により，*Anaerostipes* 属の増加 ( $p=0.002$ )，*L. brevis* の増加 ( $p<0.001$ )，*Bacteroides*

Table 4 Change of amount of defecation and the score of stool form, stool color, stool odor and feeling after defecation per a week before and after intervention of trial beverages

Outcome	Period	Observed value		Amount of change		Compared with before intervention* <sup>1</sup> (p value)	Compared between each beverages* <sup>2</sup> (p value)
		Average±SD	Median	Average±SD	Median		
Amount of defecation (equal to hen's egg-M size)	Placebo beverage	before	7.95±3.87	7.25	0.45±2.35	0.00	0.104
		after	8.39±4.13	8.63			
	KB290's beverage	before	8.31±4.48	6.95	1.09±2.48	0.88	
		after	9.40±5.08	7.98			
Stool form (1: Hard lumps- 6: Entirely liquid)	Placebo beverage	before	2.82±0.63	3.00	0.09±0.44	0.00	0.110
		after	2.91±0.54	3.00			
	KB290's beverage	before	2.86±0.59	3.00	0.00±0.39	0.00	
		after	2.86±0.52	3.00			
Stool color (1: Yellowish brown- 3: dark brown)	Placebo beverage	before	2.14±0.33	2.00	-0.01±0.15	0.00	0.002
		after	2.12±0.33	2.00			
	KB290's beverage	before	2.17±0.29	2.00	-0.12±0.20	0.00	
		after	2.06±0.22	2.00			
Stool odor (1: Odor free- 5: Strong odor)	Placebo beverage	before	3.27±0.50	3.13	-0.02±0.26	0.00	0.347
		after	3.25±0.47	3.00			
	KB290's beverage	before	3.27±0.56	3.13	-0.04±0.31	0.00	
		after	3.23±0.52	3.00			
Feeling after defecation (1: Feeling of refreshing- 3: Feeling of remaining feces)	Placebo beverage	before	2.09±0.46	2.00	-0.05±0.22	0.00	0.044
		after	2.05±0.44	2.00			
	KB290's beverage	before	2.10±0.37	2.00	-0.11±0.23	-0.07	
		after	2.00±0.39	2.00			

n = 56

\*1 Friedman test (Multiple comparisons by Holm's method).

\*2 Wilcoxon's signed rank test (Amount of defecation, stool color and odor, Feeling after defecation: one-sided test; Stool form: two-sided test).

*flagilis*の増加傾向 ( $p=0.054$ ) が認められた。  
*Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属の変化量において、試験食品間で有意差は認められなかった。

#### 6. 糞便中の有機酸濃度

糞便中の有機酸濃度の測定結果を Table 7 に示した。短鎖脂肪酸のうち、プロピオン酸の変化量は、プラセボ食品摂取期  $-2.05 \pm 8.87$  mmol/kg に対して、被験食品摂取期  $1.72 \pm 9.43$  mmol/kg であり、有意に高値を示した ( $p=0.045$ )。その他の短鎖脂肪酸、また有機酸の変化量に試験食品間で差は認められなかった。

#### 7. 有害事象

試験期間中、試験責任医師により試験食品との関連があると判定された有害事象は認められなかった。

#### IV. 考察

本試験では、便秘傾向者（排便回数  $3.7 \pm 0.9$  回/週）に対する KB290 の便通改善効果を評価した。KB290 を  $6.0 \times 10^9$  cfu 以上含む飲料を 2 週間摂取させたところ、排便機能に関わる主評価項目である排便回数及び排便日数のうち、排便日数において試験食品間で有意差が認められ、KB290 により排便日



Table 5 Change of fecal *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* before and after intervention of trial beverages analyzed reverse transcription quantitative PCR

Target	Period	Observed value		Amount of change		Compared with before intervention* <sup>1</sup> ( <i>p</i> value)	Compared between each beverages* <sup>2</sup> ( <i>p</i> value)
		Average±SD	Median	Average±SD	Median		
Total bacteria (Log cell/g)	Placebo beverage	before	11.60±0.53	11.67	0.13±0.52	0.05	0.028
		after	11.73±0.34	11.78			
	KB290's beverage	before	11.76±0.38	11.73	-0.07±0.45	-0.06	
		after	11.69±0.41	11.66			
<i>Lactobacillus</i> group (Log cell/g)	Placebo beverage	before	6.65±1.06	6.57	0.24±1.08	0.15	<0.001
		after	6.89±1.02	6.79			
	KB290's beverage	before	6.79±1.16	6.65	1.05±1.11	1.03	
		after	7.84±0.93	8.03			
<i>Bifidobacterium</i> genus (Log cell/g)	Placebo beverage	before	10.00±1.18	10.14	0.38±0.89	0.17	0.057
		after	10.37±0.61	10.49			
	KB290's beverage	before	10.28±0.70	10.35	0.09±0.68	0.08	
		after	10.36±0.67	10.42			
<i>Bifidobacterium</i> occupancy (%)	Placebo beverage	before	5.83±5.52	4.48	1.52±5.85	1.14	0.672
		after	7.35±6.45	5.52			
	KB290's beverage	before	6.04±6.22	4.04	1.08±5.14	0.64	
		after	7.12±5.62	5.62			

*n* = 52

\*1 Repeated measures analysis (Multiple comparisons by Holm's method).

\*2 Paired *t*-test (two-sided test).

数が有意に増加することが示唆された。一方、排便回数については有意な増加が認められなかったが、試験食品摂取前の排便回数が2~5回/週の研究対象者に限っては、プラセボ食品と比べて被験食品の摂取により有意な増加 ( $p < 0.05$ ) が認められた (データ示さず)。このことから、今回の試験においては、スクリーニングにより排便回数が2~5回/週の者を研究対象者に組み入れたものの、試験食品摂取前の排便回数が1回/週以下、もしくは6回/週以上の研究対象者が複数含まれており、ばらつきが大きかったために、有意差が認められなかったことが推測された。

既報<sup>6)</sup>においては、KB290を含む飲料の摂取により、今回以上の排便日数及び排便回数の増加が認められていたものの、プラセボ飲料においてもこれらの指標が増加したため、群間で有意差が得られていなかった。このことは、試験期間中のプラセボ効

果を如何にコントロールするかが重要であることを示している。本試験では、研究対象者を選定するにあたり、普段の排便頻度に加えて、事前にプラセボ食品を摂取させる期間を設けて排便頻度を調査し、プラセボ効果が発現しにくい便秘傾向者を選定した。このことにより、既報<sup>6)</sup>と比べてプラセボ効果を軽減でき、その結果、主評価項目のうち、ばらつきが比較的少ない排便日数において、被験食品の有効性を統計学的に示すことができたと考えられる。便秘の定義には様々なものがあるが、日本内科学会は、「3日以上排便がない状態、または毎日排便があっても残便感がある状態」としており、排便日数を指標にしている<sup>20)</sup>。また、排便回数は下痢のケースで極端に増加する場合もあることから、今回、排便日数において増加効果が認められたことは、KB290の便通改善作用を十分に示すものであると考えられた。

Table 6 Change of fecal microbiota before and after intervention of trial beverages analyzed using next-generation sequencer (MiSeq; illumina)

Phylum/Oder/Family/ Genus/Species	Period		Detected >0 reads number	Observed value/5000 reads		Amount of change		Compared between each beverages* (p value)
				Average±SD	Median	Average±SD	Median	
<i>Firmicutes</i>	Placebo beverage	before	51	3091.6±518.7	3149	160.5±487.0	117	0.196
		after	51	3252.1±577.2	3276			
	KB290's beverage	before	51	3131.4±517.4	3081	19.8±608.7	15	
		after	51	3151.2±554.3	3189			
<i>Bacteroidetes</i>	Placebo beverage	before	51	1523.4±533.7	1563	-79.2±472.9	-89	0.375
		after	51	1444.2±551.5	1392			
	KB290's beverage	before	51	1488.2±584.0	1495	22.0±700.4	-1	
		after	51	1510.2±601.3	1561			
<i>Proteobacteria</i>	Placebo beverage	before	51	148.8±260.2	71	-57.7±248.8	-18	0.264
		after	51	91.1±131.1	49			
	KB290's beverage	before	51	106.5±192.7	76	0.0±241.5	-2	
		after	51	106.5±147.5	69			
<i>Actinobacteria</i>	Placebo beverage	before	51	211.9±183.8	158	-19.1±139.9	-1	0.493
		after	51	192.8±149.3	145			
	KB290's beverage	before	51	245.6±230.4	159	-39.1±186.2	2	
		after	51	206.5±201.9	159			
<i>Clostridia</i>	Placebo beverage	before	51	2512.6±627.5	2552	138.2±415.3	174	0.082
		after	51	2650.8±635.0	2604			
	KB290's beverage	before	51	2539.7±603.0	2546	-11.2±523.1	-84	
		after	51	2528.5±629.1	2505			
<i>Negativicutes</i>	Placebo beverage	before	51	322.9±335.2	192	12.4±360.1	4	0.559
		after	51	335.4±357.8	210			
	KB290's beverage	before	51	330.5±307.8	239	49.4±210.5	17	
		after	51	379.8±384.7	240			
<i>Clostridiaceae</i>	Placebo beverage	before	51	568.7±212.9	544	29.8±217.9	43	0.960
		after	51	598.5±254.3	574			
	KB290's beverage	before	51	567.8±200.7	560	32.0±244.7	54	
		after	51	599.8±261.9	567			
<i>Catabacteria- ceae</i>	Placebo beverage	before	21	1.1±1.9	0	0.4±2.6	0	<b>0.035</b>
		after	26	1.4±2.6	1			
	KB290's beverage	before	23	1.1±1.4	0	-0.5±1.6	0	
		after	17	0.6±1.1	0			
<i>Ruminococca- ceae</i>	Placebo beverage	before	51	1019.5±405.7	981	105.9±269.5	77	0.055
		after	51	1125.4±419.3	1102			
	KB290's beverage	before	51	1030.8±389.9	1040	-6.7±327.4	-2	
		after	51	1024.1±389.1	1024			
<i>Enterococca- ceae</i>	Placebo beverage	before	16	7.6±37.3	0	6.8±75.3	0	0.242
		after	18	14.4±67.8	0			
	KB290's beverage	before	11	14.8±93.0	0	-12.9±93.2	0	
		after	11	1.9±6.1	0			
<i>Lactobacilla- ceae</i>	Placebo beverage	before	35	33.1±103.2	2	18.1±147.8	0	0.362
		after	38	51.2±232.8	5			
	KB290's beverage	before	40	42.7±123.0	3	-5.6±103.1	2	
		after	46	37.1±110.3	8			
<i>Eubacteriaceae</i>	Placebo beverage	before	50	174.8±115.2	163	21.8±89.9	2	0.360
		after	51	196.6±138.2	187			
	KB290's beverage	before	51	188.2±143.8	163	6.9±76.5	3	
		after	51	195.0±137.2	188			

Table 6 Continued

Phylum/Oder/Family/ Genus·Species	Period		Detected >0 reads number	Observed value/5000 reads		Amount of change		Compared between each beverages* (p value)
				Average±SD	Median	Average±SD	Median	
<i>Bacteroidaceae</i>	Placebo beverage	before	51	922.6±529.0	927	-45.8±437.9	-71	0.388
		after	51	876.9±521.3	811			
	KB290's beverage	before	51	879.8±523.9	875	37.8±457.8	-4	
		after	51	917.6±539.0	819			
<i>Prevotellaceae</i>	Placebo beverage	before	39	303.5±538.5	42	-12.1±411.1	0	0.801
		after	38	291.5±575.0	31			
	KB290's beverage	before	40	307.3±507.6	17	9.5±473.7	0	
		after	35	316.9±647.5	17			
<i>Enterobacteriaceae</i>	Placebo beverage	before	44	101.7±263.2	13	-52.2±249.8	0	0.302
		after	41	49.5±130.8	6			
	KB290's beverage	before	41	64.4±196.0	8	1.6±247.1	0	
		after	40	66.0±144.0	5			
<i>Lactobacillus</i>	Placebo beverage	before	31	19.5±92.2	1	24.5±136.9	0	0.182
		after	34	44.0±228.5	2			
	KB290's beverage	before	35	35.7±116.1	2	-7.7±95.1	1	
		after	45	28.0±108.0	5			
<i>Lactobacillus brevis</i>	Placebo beverage	before	0	0.0±0.0	0	0.0±0.0	0	<0.001
		after	0	0.0±0.0	0			
	KB290's beverage	before	0	0.0±0.0	0	2.6±3.3	1	
		after	34	2.6±3.3	1			
<i>Bacteroides fragilis</i>	Placebo beverage	before	22	19.7±55.4	0	-6.6±56.4	0	0.054
		after	20	13.1±29.0	0			
	KB290's beverage	before	18	14.5±36.6	0	12.5±43.7	0	
		after	20	27.0±71.9	0			
<i>Clostridium</i>	Placebo beverage	before	51	350.1±218.9	289	36.0±192.1	10	0.869
		after	51	386.1±267.4	314			
	KB290's beverage	before	51	345.0±187.0	323	43.2±226.9	18	
		after	51	388.2±269.5	318			
<i>Eubacterium</i>	Placebo beverage	before	50	180.0±148.7	180	14.4±87.8	5	0.605
		after	51	194.4±155.5	194			
	KB290's beverage	before	49	190.5±164.2	190	26.9±147.7	7	
		after	51	217.4±247.1	217			
<i>Anaerostipes</i>	Placebo beverage	before	49	52.0±66.4	23	-10.1±33.1	-1	0.002
		after	49	41.9±52.0	22			
	KB290's beverage	before	50	40.7±48.2	28	11.5±31.1	3	
		after	49	52.2±62.3	30			
<i>Blautia</i>	Placebo beverage	before	51	220.8±161.5	181	-13.4±116.7	-17	0.984
		after	51	207.4±164.2	157			
	KB290's beverage	before	51	220.5±175.4	180	-13.9±107.6	-12	
		after	51	206.6±172.5	169			
<i>Roseburia</i>	Placebo beverage	before	47	51.2±72.6	31	1.9±52.7	0	0.154
		after	47	53.1±72.6	26			
	KB290's beverage	before	47	78.2±105.8	40	-17.3±75.8	-4	
		after	45	60.8±77.9	34			
<i>Bifidobacterium</i>	Placebo beverage	before	47	127.2±116.0	108	-4.4±103.2	0	0.510
		after	48	122.8±115.5	86			
	KB290's beverage	before	48	150.2±155.8	103	-19.1±143.5	1	
		after	50	131.1±138.6	95			

n = 51 Less than detection limit was calculated as 0.

\* Paired t-test (two-sided test).



副次評価項目として評価した排便量や便性状、排便後の感覚のうち、便の色スコアが“黒褐色”側から“褐色・黄褐色”の方向（スコア平均値2.17→2.06）へ、また、排便後の感覚のスコアが“残便感がある”側から“普通・スッキリ感がある”の方向（スコア平均値2.10→2.00）へ、KB290摂取により有意に改善した。また、糞便中の短鎖脂肪酸及び有機酸を調べた結果、KB290摂取によるプロピオン酸の有意な増加が認められた。便の色は、腸内の有機酸が増加して酸性側になると黄褐色へ変化するといわれている<sup>21)</sup>。また、プロピオン酸は、*Bacteroides*属や*Clostridium*属等の腸内細菌により乳酸を基質として生成されることが知られている<sup>22)</sup>。腸内にて生成されたプロピオン酸は、腸上皮細胞の栄養源として吸収されて糖新生へ利用されるほか、直接、腸管の収縮運動を促す働きを持つとされている<sup>23)</sup>。KB290は生菌として腸に到達する力が強いことが人工消化液モデルの評価により示唆されていることから<sup>5)</sup>、腸内での乳酸生成に寄与し、その結果、腸内細菌によるプロピオン酸生成が促進され、腸内pH低下による便色の改善や、排便後の感覚の改善に繋がるメカニズムが推測された。

腸内細菌の変化を調べた結果、RT-PCR法及び次世代シーケンス法ともに*Bifidobacterium*属の変化量に試験食品間で有意差は認められなかった。既報<sup>6)</sup>では、KB290を含む飲料摂取により、*Bifidobacterium*占有率が増加したと報告されているが、本試験との結果の違いは測定手法の違いに起因すると考えられる。既報<sup>6)</sup>では、腸内細菌の解析に培養法を採用していた。培養法では、*Bifidobacterium*属に属するすべての菌種を検出できるが、占有率算出に必要な母数である総菌数については、すべての腸内細菌が生育可能な培地・培養条件がなく、生育可能な菌種のみで算出している<sup>24)</sup>。一方、RT-PCR法や次世代シーケンス法のような分子生物学的手法は、難培養性菌を含めて検出可能である。生菌を対象として検出するRT-PCR法の総菌数が $10^{11}$  cell/gであったのに対し、既報<sup>6)</sup>の培養法に基づく総菌数は $10^{10}$  cfu/gと、1オーダー低かった。このことから、網羅的な解析手

法と比べると、培養法では*Bifidobacterium*属に対する効果が過大に評価されている可能性があると考えられた。

KB290が帰属する*Lactobacillus*属の有意な増加は、RT-PCR法により認められたが、次世代シーケンス法では確認できなかった。次世代シーケンス法では、全5,000リードに占める検出リード数で占有率を算出しており、また、死菌と生菌の双方を検出している。RT-PCR法は*Lactobacillus*属の生菌の増減を直接比較するものであり、*Lactobacillus*属の生菌数の差の検出感度が高く、より目的に適った手法であると考えられる。RT-PCR法で検出した*Lactobacillus*属group（*Lactobacillus*属、*Leuconostoc*属、*Pediococcus*属、*Weisella*属）について、その種別の変化量を次世代シーケンス法で解析した結果、試験食品間で有意差が認められたのは、*Lactobacillus brevis*のみであった。すなわち、*Lactobacillus*属の生菌の増加はKB290摂取に起因したものであると考えられ、KB290が腸内まで生きて到達し、乳酸生成に寄与したとの推測を支持する結果である。

KB290の摂取により糞便中のプロピオン酸濃度が増加した機序としては、腸内細菌の構成比の変化が考えられる。次世代シーケンス法による解析では、プロピオン酸生成に主に寄与する*Bacteroides*属及び*Clostridium*属の変化量は、試験食品間において有意差は認められなかった。試験食品摂取前の腸内細菌の構成比は個人差が大きかったことから、試験食品間の変化量の直接比較に加えて、個人の試験食品摂取前の値をベースにした変化度合いを比較する変化量比（試験食品摂取前後の変化量/試験食品摂取前の値）についても算出し、比較した。その結果、被験食品摂取により*Bacteroides*属の増加傾向（ $p < 0.1$ ）、*Clostridium*属の有意な増加（ $p < 0.05$ ）が認められており（データ示さず）、KB290が腸内細菌の変化に影響を与えたことが示唆された。すなわち、KB290による腸内の乳酸生成量の増加が、乳酸を基質としてエネルギーを獲得している*Bacteroides*属や*Clostridium*属の生育を助け、結果としてプロピオン酸濃度が高まったことが推測

Table 7 Change of fecal organic acid before and after intervention of trial beverages

Organic acid	Period		Observed value		Amount of change		Compared with before intervention*1 (p value)	Compared between each beverages*2 (p value)
			Average±SD	Median	Average±SD	Median		
Succinate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	0.22±0.94	0.00	-0.05±1.11	0.00	1.00	0.454
		after	0.18±0.62	0.00				
	KB290's beverage	before	0.17±0.68	0.00	0.13±1.47	0.00	1.00	
		after	0.30±1.43	0.00				
Lactate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	0.29±1.09	0.00	-0.17±0.95	0.00	0.92	0.384
		after	0.11±0.40	0.00				
	KB290's beverage	before	0.56±2.16	0.00	-0.44±2.21	0.00	0.92	
		after	0.12±0.40	0.00				
Formate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	0.01±0.11	0.00	0.02±0.23	0.00	0.94	0.761
		after	0.04±0.20	0.00				
	KB290's beverage	before	0.21±0.65	0.00	-0.02±1.00	0.00	0.94	
		after	0.19±0.97	0.00				
Acetate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	55.24±26.63	48.71	-4.64±21.01	-3.58	0.67	0.489
		after	50.61±23.79	44.74				
	KB290's beverage	before	58.63±33.99	54.80	-0.84±34.74	0.26	1.00	
		after	57.79±27.68	53.71				
Propionate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	19.66±13.00	17.13	-2.05±8.87	-1.25	0.52	0.045
		after	17.61±10.46	15.14				
	KB290's beverage	before	18.89±11.03	17.90	1.72±9.43	0.48	0.78	
		after	20.60±11.23	19.02				
<i>n</i> -Butyrate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	10.33±8.68	8.14	-1.11±6.81	0.00	1.00	0.704
		after	9.22±7.29	6.64				
	KB290's beverage	before	11.97±13.51	8.75	-0.40±12.45	-0.22	1.00	
		after	11.57±10.42	10.61				
<i>n</i> -Valerate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	1.44±2.02	0.00	-0.26±1.50	0.00	1.00	0.951
		after	1.18±1.69	0.00				
	KB290's beverage	before	1.13±1.79	0.00	-0.24±1.26	0.00	1.00	
		after	0.89±1.63	0.00				
iso-Butyrate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	1.58±1.79	0.04	-0.23±1.48	0.00	1.00	0.423
		after	1.35±1.81	0.00				
	KB290's beverage	before	1.29±1.59	0.00	0.02±1.66	0.00	1.00	
		after	1.32±2.02	0.00				
iso-Valerate (mmol/kg)	Placebo beverage	before	1.64±1.93	0.00	0.00±1.72	0.00	1.00	0.804
		after	1.64±1.94	1.00				
	KB290's beverage	before	1.35±1.81	0.00	0.08±1.72	0.00	1.00	
		after	1.43±2.30	0.00				
Short-chain fatty acid (mmol/kg)	Placebo beverage	before	89.89±46.96	77.79	-8.29±34.08	-1.47	0.51	0.302
		after	81.60±40.92	72.62				
	KB290's beverage	before	93.27±55.29	86.25	0.34±51.59	-4.92	1.00	
		after	93.61±46.55	88.95				
Organic acid (mmol/kg)	Placebo beverage	before	90.41±47.25	80.80	-8.49±34.60	-1.64	0.50	0.323
		after	81.92±41.10	72.67				
	KB290's beverage	before	94.21±57.35	86.25	0.01±53.98	-4.92	1.00	
		after	94.21±47.11	89.02				

*n* = 52

Short-chain fatty acid: sum of acetate, propionate, *n*-butyrate, *n*-valerate, iso-butyrate and iso-valerate

Organic acid: sum of succinate, lactate, formate and short-chain fatty acid

\*1 Repeated measures analysis (Multiple comparisons by Holm's method).

\*2 Paired *t*-test (two-sided test).

された。

KB290による主要な腸内細菌の変化を、次世代シーケンス法のデータを用いてさらに詳細に解析した結果、*Anaerostipes*属の増加が認められた。*Anaerostipes*属は、51名中49~50名から検出されており、また、上述の変化量比についても有意な増加が認められたことから、データのばらつきが大きい腸内細菌においても信頼性が高い結果であると考えられる。*Anaerostipes*属は乳酸から酪酸を生成するが<sup>25)</sup>、糞便中の酪酸濃度に有意差は認められなかった。酪酸生産菌は他にも*Clostridium*属や*Eubacterium*属があり、いずれも変化量比においてはKB290摂取による有意な増加 ( $p < 0.05$ ) が認められた (データ示さず)。しかしながら、酪酸は腸上皮細胞の重要なエネルギー源として大部分が消費されることから<sup>23)</sup>、本試験では、糞便中の濃度差を検出できなかったと考えられる。酪酸は腸上皮細胞の増加や、タイトジャンクションタンパク質の発現増加を促すことが知られていることから<sup>26)</sup>、これらの結果は、KB290が、腸の機能を健康に保つために重要な腸内環境に対してよい影響を及ぼしていることを期待できるものである。

以上のことから、KB290の摂取による便秘改善効果は、腸内細菌や糞便中の短鎖脂肪酸で構成される腸内環境を良好にすることで発揮されたものと考えられた。すなわち、KB290は安全性が高く、便秘改善効果の有効性が期待できるプロバイオティクスであることが本試験の結果においても支持された。

## V. 結論

便秘傾向の成人男女にKB290を $6.0 \times 10^9$  cfu以上/本含む飲料を1日1本摂取させたところ、プラセボ食品と比較して有意に排便日数の増加、排便後の感覚の改善、便の色の改善が認められたことから、KB290の摂取は便秘改善に有効であることが示唆された。また、そのメカニズムとして、腸内細菌によるプロピオン酸の生成を促し、腸管の蠕動運動機能を高めたことが推察された。

## 謝 辞

本研究の計画にあたり貴重なご助言を頂きました、昭和女子大学の飯野久和教授に深謝いたします。

## 利益相反

本研究はカゴメ株式会社が提供する委託研究費によって、株式会社ケイ・エス・オーとカゴメ株式会社によって実施された。本研究に関して、カゴメ株式会社から株式会社ケイ・エス・オーへの委託研究費以外の研究費及び寄付金の支払いは無い。また本試験に参与する株式会社ケイ・エス・オーの社員に関して、カゴメ株式会社との雇用関係、及びカゴメ株式会社の社員と親族等の血縁関係は無い。

## 参考文献

- 1) Fuller R: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**(5), 365–378, 1989.
- 2) Evivie SE, Huo GC, Igene JO, Bian X: Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food Nutr. Res.*, **61**(1), 1318034, eCollection, 2017.
- 3) Selber-Hnatiw S, Rukundo B, Ahmadi M, Akoubi H, Al-Bizri H, Aliu AF, Ambeaghen TU, Avetisyan L, Bahar I, Baird A, Begum F, Ben Soussan H, Blondeau-Éthier V, Bordaries R, Bramwell H, Briggs A, Bui R, Carnevale M, Chancharoen M, Chevassus T, Choi JH, Coulombe K, Couvrette F, D' Abreau S, Davies M, Desbiens MP, Di Maulo T, *et al.*: Human Gut Microbiota: Toward an Ecology of Disease. *Front. Microbiol.*, **8**, 1265, eCollection, 2017.
- 4) Kishi A, Uno K, Matsubara Y, Okuda C, Kishida T: Effect of the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. coagulans on interferon-alpha producing capacity in humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, **15**(4), 408–412, 1996.
- 5) Suzuki S, Yakabe T, Suganuma H, Fukao M, Saito T, Yajima N: Cell-bound exopolysaccharides of *Lactobacillus brevis* KB290: Protective role and monosaccharide composition. *Can. J. Microbiol.*, **59**(8), 549–555, 2013.
- 6) Nobuta Y, Inoue T, Suzuki S, Arakawa C, Yakabe T, Ogawa M, Yajima N: The efficacy and the safety of *Lactobacillus brevis* KB290 as a human probiotics. *Int. J. Probiotics Prebiotics*, **4**(4), 263–270, 2009.
- 7) Kishida T, Uno K, Kishi A, Onishi T, Matsubara



- Y: Enhancement of immunological functions by *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans*. 基礎と臨床, **27**(9), 3701–3707, 1993
- 8) Waki N, Matsumoto M, Fukui Y, Suganuma H: Effects of probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 on incidence of influenza infection among schoolchildren: An open-label pilot study. *Lett. Appl. Microbiol.*, **59**(6), 565–571, 2014.
- 9) Yakabe T, Moore EL, Yokota S, Sui H, Nobuta Y, Fukao M, Palmer H, Yajima N: Safety assessment of *Lactobacillus brevis* KB290 as a probiotic strain. *Food Chem. Toxicol.*, **47**(10), 2450–2453, 2009.
- 10) Fukao M, Tomita H, Yakabe T, Nomura T, Ike Y, Yajima N: Assessment of antibiotic resistance in probiotic strain *Lactobacillus brevis* KB290. *J. Food Prot.*, **72**(9), 1923–1929, 2009.
- 11) Gueimonde M, Tölkö S, Korpimäki T, Salminen S: New real-time quantitative PCR procedure for quantification of *Bifidobacteria* in human fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(7), 4165–4169, 2004.
- 12) Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A: Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.*, **97**(6), 1166–1177, 2004.
- 13) Lee DH, Zo YG, Kim SJ: Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(9), 3112–3120, 1996.
- 14) Illumina, Inc.: Home Page, [http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) [accessed 2017-8-25].
- 15) 服部正平：ヒト腸内マイクロバイーム解析のための最新技術. 日本臨床免疫学会誌, **37**(5), 412–422, 2014.
- 16) Kim SW, Suda W, Kim S, Oshima K, Fukuda S, Ohno H, Morita H, Hattori M: Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res.*, **20**(3), 241–253, 2013.
- 17) Tsukahara T, Matsukawa N, Tomonaga S, Inoue R, Ushida K, Ochiai K: High-sensitivity detection of short-chain fatty acids in porcine ileal, cecal, portal and abdominal blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Anim. Sci. J.*, **85**(4), 494–498, 2014.
- 18) 芳賀敏郎：医薬品開発のための統計解析 第2部 実験計画法 改訂版, 277–285, サイエンス社, 2014 (ISBN-13: 978-4860790745).
- 19) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.*, **48**(3), 452–458, 2013.
- 20) Tamura A, Tomita T, Oshima T, Toyoshima F, Yamasaki T, Okugawa T, Kondo T, Kono T, Tozawa K, Ikehara H, Ohda Y, Fukui H, Watari J, Miwa H: Prevalence and self-recognition of chronic constipation: Results of an internet survey. *J. Neurogastroenterol. Motil.*, **22**(4), 677–685, 2016.
- 21) 日本乳酸菌学会編：乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 495–504, 京都大学学術出版, 2010 (ISBN-13: 978-4876989829).
- 22) 渡部侑子：腸内糖代謝と腸内細菌. 腸内細菌学雑誌, **19**, 169–177, 2015.
- 23) 坂田 隆, 市川宏文：短鎖脂肪酸の生理活性. 日本油化学会誌, **46**(10), 1205–1212, 1997
- 24) 藤本淳治, 福井 学：腸内フローラの構造解析：16S rDNA-クローンライブラリー法. 腸内細菌学雑誌, **19**, 47–52, 2005.
- 25) Davis G: Enumeration of probiotics strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **103**, 9–17, 2014.
- 26) Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L: *Bifidobacteria* and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front. Microbiol.*, **28**, 979, eCollection, 2016.