

ヒトの乳糖利用性に係わる乳糖の消化性と腸内細菌による分解性に関する研究

県立長崎シーボルト大学看護栄養学部 教授 奥 恒 行

要 約

本研究では、現代人の若い被験者は乳糖に対する腸内細菌の資化性が高いという仮説のもとに、ヒトに乳糖および他の難消化吸収性糖質を10g~30g摂取させ、血糖、血清インスリンならびに呼気水素ガス排出量からラクターゼ活性と乳糖利用能を観察した。さらに、手術時に摘出された小腸組織を用いて日本人のラクターゼならびに他の二糖類水解酵素活性がどのような状態であるかを観察し、ラットのそれと比較・検討した。さらに、ラットへ乳糖または難消化性オリゴ糖・糖アルコール含有飼料を摂取させて馴化させ、適応による小腸粘膜ラクターゼ活性への影響ならびに腸内細菌による乳糖の発酵分解性について検討した。

その結果、日本人の乳糖の消化吸収能は1回10g前後と推定された。それ以上に摂取した乳糖は腸内細菌によって発酵分解されることが明らかになった。日本人60歳前後の小腸ラクターゼ活性は回腸では検出限界以下で、空腸下部のそれはスクラーゼ活性の1/5-6、マルターゼ活性の1/24-29であった。さらに、乳糖を継続的に摂取させたラットでは乳糖の資化性が亢進することから、現代の若者には乳糖を活発に発酵分解する腸内細菌が棲み付いていることが示唆された。

キーワード：ラクターゼ活性、乳糖、乳糖利用能、呼気水素ガス、ヒト小腸二糖類水解酵素、腸内細菌、発酵分解。

I. 研究の概要

日本人は小腸粘膜に存在する乳糖分解酵素であるラクターゼ活性が欧米白人に比べて全体的に低いために、牛乳を一度に大量に摂取すると未消化の乳糖の大腸への流入量が多くなって高浸透圧性の下痢が生じやすいと考えられている¹⁾。小腸粘膜ラクターゼ活性は哺乳期に高く、離乳後徐々に低下するが²⁾、これは離乳に伴って乳糖摂取量が減少するためと考えられる。また、基質となる乳糖を添加した飼料を与えた動物ではラクターゼ活性が誘導されることも知られている³⁾。

一方、消化されずに大腸に流入した乳糖は腸内細菌によって資化（発酵分解）され、利用される。腸内細菌叢は食事、年齢、体調、環境、ストレスなどのいろいろな要因によって変化するので⁴⁾、腸内細菌による乳糖の資化性も個人差が大きいことが考えられる。例えば、乳糖の繰返し摂取によって乳糖を選択的に資化する腸内細菌が増加すれば、乳糖摂取時の乳糖分解が亢進することになり、またラクターゼ活性が高くなれば消化が亢進するので下痢は生じにくくなる。

しかしながら、現代の日本人がどの程度まで牛乳あるいは、それに含まれる乳糖を摂取しても下痢等の副作用を誘発しないかは明らかでない。外国人についても系統立てて下痢に対する最大無作用量（許容量）を測定した報告はない。乳児についてはその許容量の概算値を示したのものがある程度である。昨年の本研究助成金において、日本人成人における乳糖の下痢に対する最大無作用量（許容量）を測定したところ、非消化性オリゴ糖や糖アルコールの最大無作用量が体重kg当たり約0.3gであるのに対して、乳糖の最大無作用量は体重kg当たり0.76gとかなり高いことが明らかになった⁵⁾。

さらに、乳糖の消化性を観察するために、下痢を誘発しにくい被験者に乳糖30g、ブドウ糖15g（乳糖30gに含まれるブドウ糖相当量）、難消化性二糖アルコールであるラクチトール30gをそれぞれ摂取させ、血糖値ならびに血清インスリン濃度、呼気水素ガス排出量を測定し、その生体利用能を検討した。その結果、乳糖30g負荷では血糖値および血清インスリンは極めて僅かしか上昇せず、呼気水素ガス排出量は難消化性糖質と同レベルに予想外に多く排出された。すなわち、摂取した乳糖がラクターゼによって消化されて、利用される比率は極めて僅かであることが示唆された⁵⁾。

日本人、特に成人のラクターゼ活性は予想していた以上に低いにもかかわらず、乳糖の下痢に対する最大無作用量（許容量）が他の難消化性糖アルコールやオリゴ糖のそれよりも極めて高いことが明らかになった。その要因の1つとして、現代人は難消化性オリゴ糖や糖アルコールを摂取する機会が多くなってきているために、これらの糖質を資化する腸内細菌が多くなり、その影響が乳糖の発酵分解性を高めていることが推察される。

そこで、本研究では、現代人の若い被験者は乳糖に対する腸内細菌の資化性が高いという仮説のもとに、ヒトに乳糖および他の難消化吸収性糖質を摂取させ、血糖、血清インスリンならびに呼気水素ガス排出量からラクターゼ活性と乳糖利用能を観察した。さらに、手術時に摘出された小腸組織を用いて日本人のラクターゼならびに他の二糖類水解酵素活性がどのような状態であるかを観察し、ラットのそれと比較・検討した。

一方、ラットへ乳糖ならびに難消化性オリゴ糖・糖アルコールを含有する飼料を摂取させて馴化させ、適応による小腸粘膜ラクターゼ活性への影響ならびに腸内細菌による乳糖の発酵分解性について検討した。

本研究は大別して以下の4つから成る。

- 1) ヒトを用いた乳糖およびブドウ糖負荷試験による乳糖消化能の推定。
- 2) ヒトにおける乳糖および他の難消化性オリゴ糖・糖アルコール摂取時の呼気水素ガス排出量による利用性の比較・検討。
- 3) 手術時に摘出したヒト小腸組織のラクターゼならびに他の二糖類水解酵素活性
- 4) ラット小腸粘膜ラクターゼに及ぼす乳糖ならびに難消化性糖質馴化の影響
- 5) ラット腸内細菌による乳糖の発酵分解性に及ぼす乳糖ならびに難消化性糖質馴化の影響。

なお、本学術研究助成による研究は、本学の研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

II. ヒトを用いた乳糖およびブドウ糖負荷試験による乳糖消化能に関する研究

1. 研究目的

先の研究において、ヒトが乳糖を摂取したとき、どの程度消化され、生体で利用されるかを観察するために、被験者に乳糖30g、難消化性二糖アルコールであるラクチトール30gまたはブドウ糖15g (乳糖30gに含まれるブドウ糖相当量)をそれぞれ摂取させ、血糖値ならびに血清インスリン濃度、呼気水素ガス排出量を測定し、その生体利用能を検討した。その結果、乳糖30g負荷では血糖値および血清インスリンは極めて僅かしか上昇せず、呼気水素ガス排出量は難消化性糖質と同レベルに予想外に多く排出された⁵⁾。すなわち、摂取した乳糖がラクターゼによって消化されて、利用される比率は極めて僅かであることが示唆された。

そこで、本研究では日本人は摂取した乳糖何g程度を消化吸収できるかに焦点を当て、乳糖投与レベルを変えたときの血糖値ならびにインスリン濃度の変化、呼気水素ガス排出量から日本人における乳糖消化量を推定することを目的に実施した。

2. 被験者、実験材料ならびに方法

1) 被験者

本研究の目的、実験内容、試験物質摂取による下痢誘発と異常な胃腸症状の発生等について十分説明し、実験への協力を承諾した健康な女子大生(19~22歳)30~40名を対象として最大無作用量実験を実施した。これらの被験者の中から、乳糖30g摂取で下痢を誘発しない者10名を選び、乳糖負荷試験を実施した。被験者の属性は表1の通りである。

Table 1. Characteristics of the subjects

Age (y)	19.8±0.8
Weight (kg)	50.5±5.1
Height (cm)	157.7±5.0
BMI (g/m ²)	20.3±2.3

Female, n=35. Values are Mean±S.D.

2) 試験物質

乳糖を摂取させるにあたり、ネガティブコントロールとしてブドウ糖を用いた。試験物質の純度ならびに入手先は以下の通りである。

①乳糖(純度98%以上、明治乳業(株))

②ブドウ糖(純度99%以上、和光純薬(株))

*いずれも粉末または粒子状

3) 試験物質摂取量および摂取方法

乳糖摂取量は被験者の誰もが下痢を誘発しないできるだけ多い量とし30gを用いた。摂取量が多

いほど血糖値の上昇ならびに呼気水素ガス排出量が顕著になり、変化が観察されやすいからである。一方、すでにに実施した実験において、乳糖30g摂取では血糖上昇はごく僅かで、呼気水素ガス排出量が多かったため、被験者の乳糖消化能は10~20g程度であることが推察された。そこで、今回は、摂取した乳糖の消化能を推定するために、乳糖10g摂取群を設けた。ネガティブコントロールであるブドウ糖摂取量は、乳糖30gに含まれるブドウ糖換算量の15gと乳糖少量投与時と同量の10gとした。

被験者は前日午後8時まで夕食を食べ、その後はお茶や水などの飲食に制限し、実験当日、朝食抜きで研究室に来させ、血圧などを測定して体調をチェックし、異常のない者について空腹時における採血ならびに呼気を採取した。採血および呼気採取後、直ちに乳糖10gまたは乳糖30g、およびブドウ糖10gまたは15gを水溶液(100~200ml)にして摂取させ、摂取後30分毎に3時間まで採血ならびに呼気採取を行い、以後6時間までは呼気採取のみを行った。摂取後から採血終了(摂取後3時間)まで何も食べないよう指導した。採血終了後(3時間後)、空腹をいやすために水素ガスを産生しない易消化性のクッキーと清涼飲料(250ml)(計350kcal)を摂取させ、6時間後まで呼気採取を行った。試験物質負荷実験1-2週間後、次の試験物質の負荷実験を同様に実施した。

4) 採血ならびに呼気採取

採血は上腕静脈から以下のように計7回行った。糖質摂取前、摂取後30分、60分、90分、120分、150分、180分。

呼気は安静状態で特殊なコレクションバッグ(約750ml)を用い、死腔量約150mlを除いて以下のように計13回採取した。糖質摂取前、摂取後30分、60分、90分、120分、150分、180分、210分、240分、270分、300分、330分、360分。

採血、呼気採取、試験食の摂取などの実験プロトコルは図1に示した通りである。

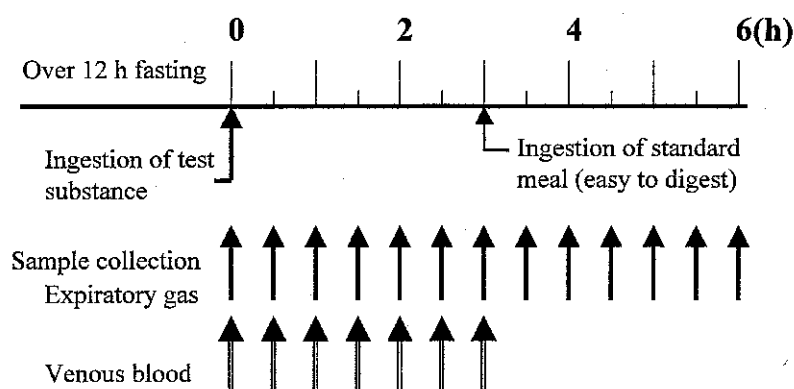


Fig. 1. Experimental protocol

5) 測定および調査項目

(1) 血糖値の測定

血清ブドウ糖濃度はグルコースオキシダーゼを用いるKunstらの方法に準じて測定した⁶⁾。

(2) 血清インスリンの測定

血清インスリン濃度は、モルモットインスリン抗血清を用いた酵素免疫法キット（森永生科学研究所、横浜市）を用いて測定した⁷⁾。

(3) 呼気採取と水素ガス分析

呼気中の水素ガス濃度はBreath Analyzer TGA-2000（テラメックス、京都市）を用いて測定した⁸⁾。

6) 統計処理

血糖値の経時変化ならびに呼気水素ガス排出量の経時変化における差の検定は、対応のある t 検定により行い、5%未満を有意水準とした。

3. 結果ならびに考察

乳糖30g摂取時の血糖上昇や呼気水素ガス排出量などから若い日本人の乳糖消化能力は10g前後ではないかと推定された。そこで、被験者（7名）に乳糖10gまたはブドウ糖10gを摂取させ、血糖、血清インスリンならびに呼気水素ガス排出量を経時的に測定し、乳糖30gのそれと比較した。

1) 乳糖10gまたは30gおよびブドウ糖10g摂取時の血糖、血清インスリンならびに呼気水素ガス排出量の経時変化

ブドウ糖10gあるいは15g摂取でも明白な血糖値ピークが観察されたが、乳糖10g（7名）および30g（10名）摂取時の血糖変化には顕著な差異は観察されず、いずれも明確なピークは見られなかった（図2）。乳糖10g摂取と30g摂取で血糖の変化にほとんど差異が見られなかったのは、被験者の乳糖消化能力が低いことを示している。

一方、図3に示すように、呼気水素ガス排出量には乳糖10g摂取と30g摂取で顕著な差異が観察された。乳糖10g摂取では6時間の水素ガス排出量は僅かであったが、乳糖30g摂取では10g摂取の3倍以上であった。これはラクターゼ活性が低いために、乳糖20g以上が未消化の形で大腸に到達す

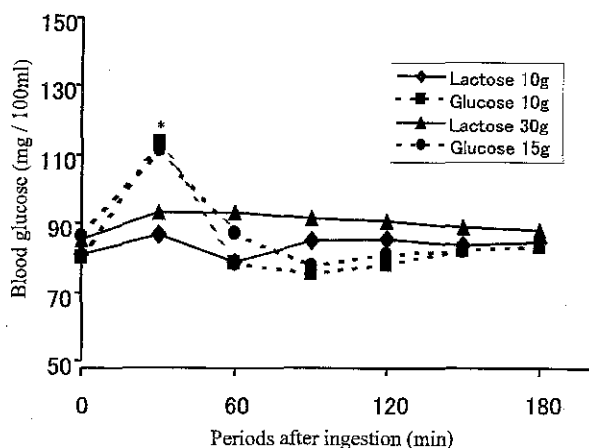


Fig. 2. Dose dependency of blood glucose by oral ingestion of lactose and glucose

*: There was a significant difference from blood glucose between 10g of lactose and same dosage of glucose orally ingested in healthy female, $p < 0.05$ by ANOVA.

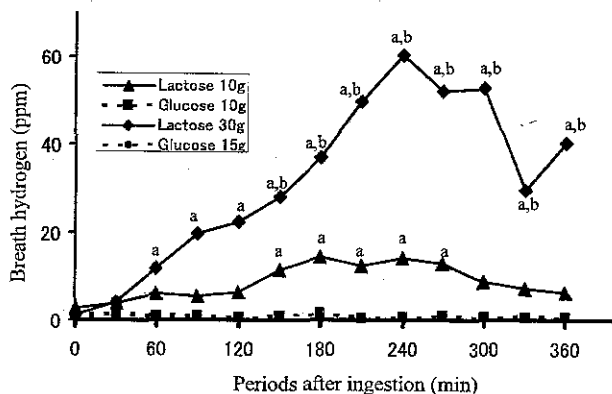


Fig. 3. Dose dependency of breath hydrogen excretion by oral ingestion of lactose and glucose

a: There was significant difference from breath hydrogen gas excretion among 10 g of lactose, 30 g of lactose, and both 10 g and 15 g of glucose, at $p < 0.05$ by ANOVA.

b: Breath hydrogen excretion by oral ingestion of 10g of lactose was more than that of 30 g of lactose, at $p < 0.05$ by student's t-test..

ることを示唆している。すなわち、日本人若年者が1度に摂取して消化できる乳糖量は10g程度ではないかと考える。

牛乳1本(200ml)には乳糖約9gが含まれている。この程度の量であれば多くの者が消化吸収して利用すると考えられるが、それ以上になると大腸へ移行する乳糖量が増加して腸内細菌叢に影響をもたらすことになる。

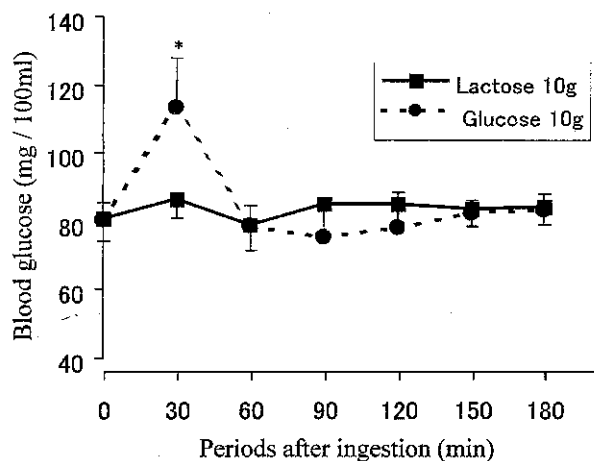


Fig. 4. Difference from increasing in blood glucose between lactose and glucose orally ingested

*: There was a significant difference from blood glucose between 10g of lactose and same dosage of glucose orally ingested in healthy female, $p < 0.01$ by paired student's t-test.

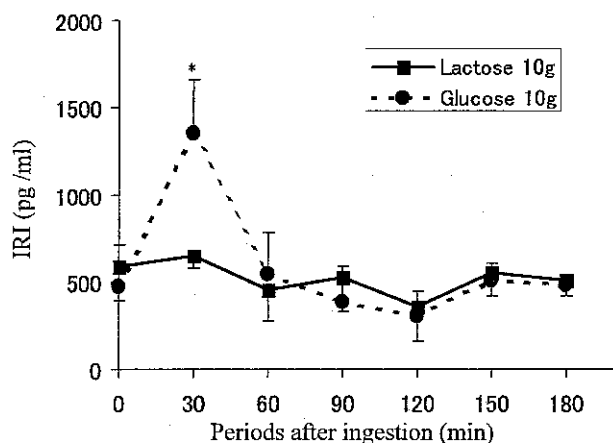


Fig. 5. Difference from secretion of serum insulin between lactose and glucose orally ingested

*: There was a significant difference from secretion of serum insulin between 10 g of lactose and same dosage of glucose orally ingested in healthy female, at $p < 0.05$ by paired student's t-test.

IRI: immunoreactive insulin.

2) 乳糖10g摂取時の血糖、血清インスリンならびに呼気水素ガス排出量の経時的变化

図4に示すように、ブドウ糖10g摂取で血糖値は摂取30分後にピークを示し、60分後はほぼ空腹時レベルに低下した。これに対し、乳糖10g摂取では全く反応を示さなかった。血清インスリン濃度の変化は血糖の変化によく対応し、ブドウ糖10g摂取では30分後にピークになり、60分後では空腹時レベルに戻った(図5)。しかし、乳糖10g摂取では全く反応を示さなかった。

一方、ブドウ糖10g摂取時の呼気水素ガス排出量はベーザルレベルから全く上昇しなかったが、乳糖10g摂取では摂取120分後頃から上昇し始め、180分後頃ピークに達して270分後まで維持し、その後徐々に減少した(図6)。このことは、乳糖10g摂取でも未消化の形で大腸に到達する部分がある程度存在することを示している。同時に、腸内細菌が乳糖を発酵分解していることを示し

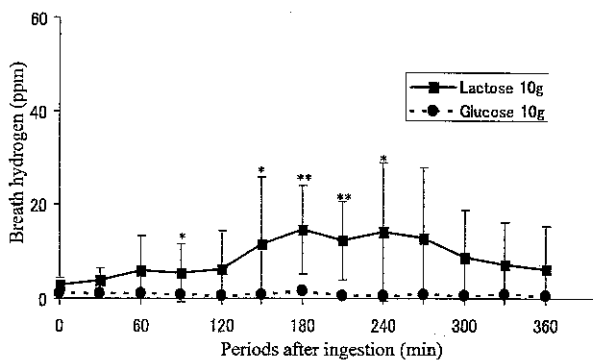


Fig. 6. Profiles of breath hydrogen excretion by oral ingestion of lactose and glucose

*, **: Breath hydrogen excretion by oral ingestion of 10g of lactose was more than that of glucose in healthy female, at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ by paired student's t-test..

ている。しかし、この程度の摂取量は腸内細菌の分解能力の範囲内であるので、下痢を生じることはない。

3) 乳糖10g摂取時の血糖上昇にresponseする者と、しない者についての解析

乳糖10gを摂取した被験者7名の測定値を詳細に見ると、乳糖摂取後、血糖値がある程度上昇する者(3名)と、ほとんど上昇しない者(4名)に分けることができる。そこで、血糖上昇responserと、non-responserに分けてデータを解析してみた。

図7は、この時の血糖値の変化を示したものである。血糖上昇responserの上昇率は顕著であったが、non-responserの血糖上昇は乳糖10g摂取ではほとんど観察されなかった。図8はこの時の呼気水素ガス排出量の変化を示したものである。血糖上昇responserの呼気への水素ガス排出量はごく僅かに観察されたが、血糖上昇non-responserの水素ガス排出量は、乳糖摂取後60分後から上昇し始め、150分後から急増して血糖上昇responserと明らかな違いを示した。すなわち、乳糖10g程度を摂取したとき、ラクターゼで消化して利用する者と、乳糖の消化能力が低い(10g以下)ために腸内細菌による発酵分解を介して利用する者が存在することを示している。

これらの結果は、日本人にはラクターゼ活性の極めて低い者と、ある程度ラクターゼ活性を持っている者が存在することを示している。

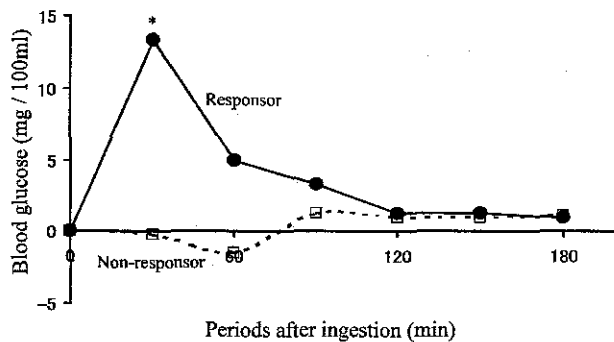


Fig. 7. Comparison with increments of blood glucose versus fasting level between blood glucose responsora to lactose and non-responserb

a: The subjects whose blood glucose were increased by oral ingestion of 10 g of lactose (n=3). b: The subjects whose blood glucose were not increased by oral ingestion of 10 g of lactose (n=4).

*: Increments of blood glucose versus fasting level (0 min) in blood glucose glucose responsor, was significantly higher than that of non-responser, at $p < 0.05$ by student's t-test.

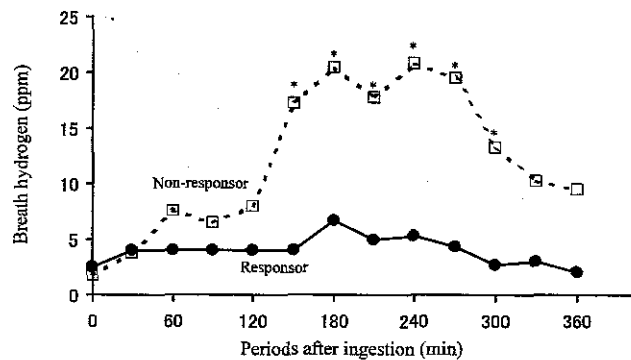


Fig. 8. Comparison with breath hydrogen gas excretion in lactose ingestion between blood glucose responsora and non-responserb

a: The subjects whose blood glucose were increased by oral ingestion of 10 g of lactose (n=3). b: The subjects whose blood glucose were not increased by oral ingestion of 10 g of lactose (n=4).

*: There was significant difference in breath gas excretion between blood glucose responsor to lactose and non-responser, at $p < 0.05$ by student's t-test.

Ⅲ. ヒトにおける乳糖ならびに他の難消化性糖質摂取による呼気水素ガス排出動態の比較実験

1. 目的

消化されない糖質を摂取すると、その消化性と摂取量を反映して呼気への水素ガス排出が行われる。乳糖摂取では予想外に大量の水素ガスが排出されたので、本研究では乳糖摂取量が異なるときの呼気水素ガス排出量が他の難消化吸収性糖質ならびに部分消化吸収性糖質摂取時とどのように異なるかを比較・検討した。

2. 被験者、材料ならびに実験方法

1) 被験者

本研究の目的、実験内容、試験物質摂取による下痢誘発と異常な胃腸症状の発生等について十分説明し、被験者として協力を承諾した健康な女子大生（19～25歳）20～30名を対象とした。

2) 試験物質

乳糖を摂取させるにあたり、ネガティブコントロールとしてブドウ糖を用いた。試験物質の純度ならびに入手先は以下の通りである。

- ①乳糖（純度98%以上、明治乳業（株））
- ②エリスリトール（純度99%以上、日研化学（株））
- ③キシリトール（純度98%以上、ダニスコジャパン（株））
- ④ラクチュロース（純度98%以上、森永乳業（株））
- ⑤トレハロース（純度98%以上、（株）林原生物化学研究所）

*いずれも粉末または粒子状

3) 試験物質摂取量および摂取方法

先の研究において、被験者の乳糖消化能は10～20g程度であることが推察されたので、単糖ならびに二糖の摂取量は10gまたは20gとした。

被験者は前日午後8時までに夕食を食べ、その後はお茶や水などの飲食に制限し、実験当日、朝食抜きで研究室に来させ、血圧など測定して体調をチェックし、異常のない者について空腹時における呼気を採取した。直ちに乳糖またはその他の試験物質指示量をあらかじめ水（約100～150ml）に溶かした水溶液を摂取させ、摂取後30分ごとに5～6時間まで呼気採取を行った。試験物摂取3時間後、空腹をいやすために水素ガスを産生しない易消化性のクッキーと清涼飲料（250ml）（計350kcal）を摂取させた以外は、実験が終了する5～6時間後まで何も食べないよう指導した。

4) 呼気採取と水素ガス分析

呼気は安静状態で特殊なコレクションバッグ（約750ml）を用い、死腔量約150mlを除いて以下のように計13回採取した。糖質摂取前、摂取後30分、60分、90分、120分、150分、180分、210分、240分、270分、300分、330分、360分。

呼気中の水素ガス濃度はBreath AnalyzerTGA-2000（テラメックス、京都市）を用いて測定した。

3. 結果ならびに考察

エリスリトール10~20g摂取では摂取したエリスリトールの90%以上は小腸で吸収され、代謝されずに尿中へ排泄される。また、キシリトールは一部が小腸から吸収され、エネルギー源として代謝される。エリスリトール10g摂取では呼気水素ガスはほとんど排出されず、摂取量を20gに増加すると僅かに排出が見られた（図9）。キシリトール10g摂取の水素ガス排出量はエリスリトールのそれに比べてやや多かった（図9）。これは両者の吸収率の差によるものとする。キシリトール20g摂取では水素ガス排出量はさらに増加した。これらの結果は、エリスリトールに対する小腸の吸収能が10gと20gの間にあることを示すと共に、キシリトールに対する小腸の吸収能は10g以下であることを示している。

これらの結果は大腸に到達する糖質量に対応して呼気水素ガス排出が観察されることを示している。

一方、部分的に消化されるトレハロースならびに全く消化されないラクチュロースを10gまたは20g摂取したときの呼気水素ガス排出量の経時的变化を示したものが図10である。トレハロース10g摂取では呼気水素ガス排出量は僅かで、キシリトール10g摂取よりもやや多い程度であった。これはトレ

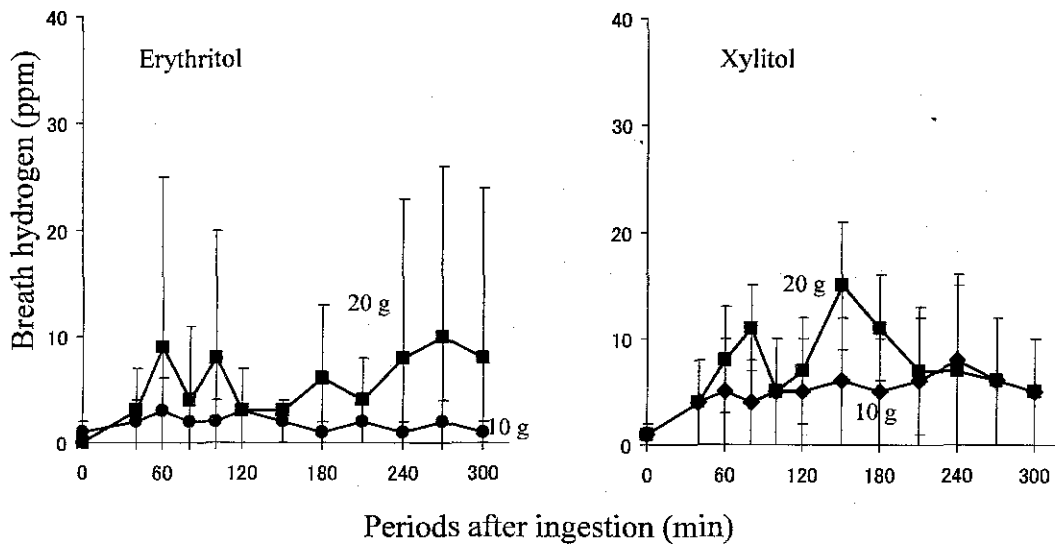


Fig. 9. Dose dependency of breath hydrogen excretion by oral ingestion of erythritol and xylitol

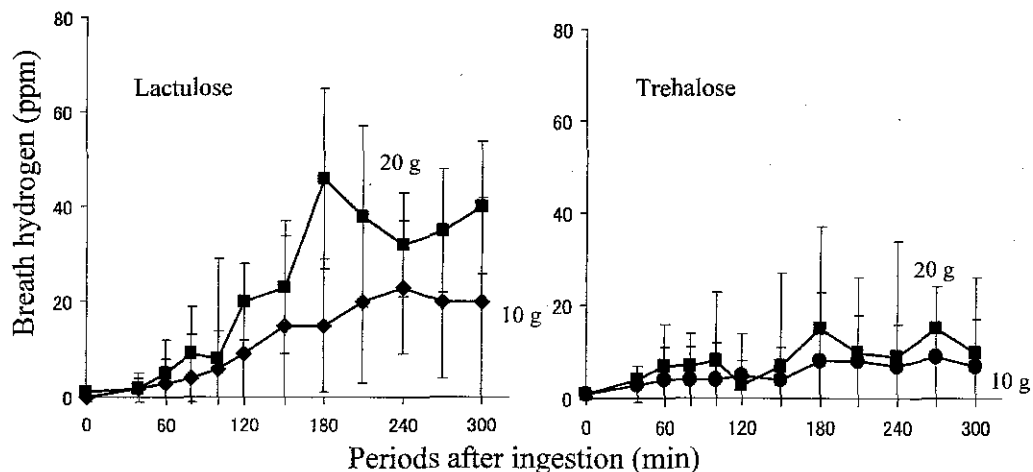


Fig. 10. Dose dependency of breath hydrogen excretion by oral ingestion of lactulose and trehalose

ハロースが消化されるために、大腸到達量が少ないことを示している。トレハロース摂取量を20gに増加しても水素ガス排出量は僅かしか増加しなかった。トレハラーゼ活性はマルターゼやスクラーゼ活性に比べて低く、またトレハラーゼ活性が高い者と低い者の存在することが知られている⁹⁾。トレハラーゼ20g摂取でも水素ガス排出量が僅かしか増加しなかったのは、トレハラーゼ活性の高い被験者が含まれていたためと思われる。

これに対し、消化酵素で全く消化されないラクチュロース10gを摂取したとき、呼気水素ガスは摂取後90分ごろから排出し始め、4時間後にはピークに達した。摂取量を20gに増加するとそれに対応して呼気水素ガス排出量は顕著に増加した。

これらの結果は、呼気水素ガス排出量は摂取する糖質の消化吸収性をよく反映することを示している。乳糖10gまたは30g摂取で呼気水素ガス排出量が明らかに異なったのはラクターゼ活性が低く、限界のあることを反映している。また、乳糖30g摂取時の呼気水素ガス排出量(図3)がラクチュロース20g摂取の排出量よりも多いことは、摂取した乳糖30gのうち消化される量が10g以下に過ぎないことを支持している。

IV. ヒト小腸粘膜のラクターゼおよび他の二糖類水解酵素活性

1. 研究目的

ヒトに乳糖、ラクチトール、ブドウ糖などをそれぞれ摂取させ、血糖値ならびに血清インスリン濃度、呼気水素ガス排出量から乳糖の生体利用能を検討したところ、乳糖負荷したときの血糖値ならびに血清インスリン濃度は極めて僅かしか上昇せず、逆に呼気水素ガス排出量は予想外に多く排出された。すなわち、日本人のラクターゼ活性は非常に低いことが推察された。しかし、日本人のラクターゼ活性がどの程度かは明らかにされていない。

そこで、がんなどの手術時に摘出された日本人の小腸組織が入手できたので、ラクターゼ活性ならびに他の二糖類水解酵素活性を測定し、ラクターゼ活性と他の二糖類水解酵素活性がどのような関係にあるかを検討すると共に、ラットのそれと比較・検討してみた。

2. 実験材料ならびに方法

1) ヒト小腸組織標本と小腸粘膜ホモジネートの調製

ヒト小腸は、がんなどの手術時に摘出されたものを実験に供するまで凍結保存(-80℃)した。小腸組織(5標本)は手術時に摘出したものであるため、標本によって小腸部位ならびに組織重量が著しく異なった。4標本は小腸下部、特に回腸下部から摘出されたもので、1標本のみが空腸下部であった。なお、手術を受けた患者の平均年齢は63.8歳(51-76歳)であった。

解凍した小腸組織を氷冷した生理食塩水で洗浄し、ペーパータオルで水分を除去後、氷冷したガラス板上でスライドガラスを用いて粘膜を剥離した。湿重量を秤量後、生理食塩水にて5%ホモジネートを調製し、使用するまで凍結保存(-80℃)した。

2) 実験動物

Wistar系雄ラット (250-280g) を固形飼料 (MF、オリエンタル酵母 (株)) で、10~14日間グループ飼育した (3~4匹/ケージ)。飼料および水は自由に摂取させ、実験に供する前に16時間絶食させた。なお、飼育室の条件は室温23-25℃、湿度50~60%、室内照明は12時間サイクル (明期08:00~20:00、暗期20:00~08:00) であった。

3) ラット小腸粘膜ホモジネートの調製

と殺後、直ちに全小腸を取り出して縦に切り開き、0.9%NaCl溶液で洗浄し、ペーパータオルで水滴を除去してから氷冷したガラスプレート上で粘膜を剥離した。小腸粘膜に0.9%NaCl溶液を9倍量加えてホモジネートを調製し、適当に希釈して二糖類水解酵素活性の測定に用いた。

4) 小腸粘膜二糖類水解酵素活性の測定

二糖類水解酵素活性はglucose oxidaseを用いるDahlqvistの方法¹⁰⁾を改変した奥らの方法で測定した¹¹⁾。基質には112mMのマルトース、イソマルトース、スクロース、トレハロース、ラクトース溶液 (0.1 M Maleate-Na buffer, pH6.0に溶解したもの) を用いた。基質液0.1mLに適当に希釈した小腸粘膜ホモジネート0.1mLを加えて20~30分間反応後、TGO試薬 (最終濃度がglucose oxidase 10 U/mL, peroxidase 5 U/mL, 4-aminoantipyrine 0.5 mM, p-phenolsulfonic acid sodium salt 20 mMとなるように、0.5M Tris-Cl buffer (pH 7.1) に溶解したもの) 2.2mLを加えて、さらに10分間反応させた。反応後、4 N NaOH 2~3滴加えて反応を停止させ、分光光度計 (UVmini-1240、島津製作所) を用いて波長500nmにおける吸光度を測定した。各酵素比活性は μ moles of substrate hydrolyzed/mg protein/hrで表した。たんぱく質濃度はBradfordの方法で測定した¹²⁾。

5) 基質に用いた糖質

ヒトおよびラット小腸粘膜を用いた消化実験の基質 (いずれも純度99%以上) には、マルトース、トレハロース (いずれも (株) 林原生物化学研究所)、パラチノース (三井製糖 (株))、スクロース、ラクトース (いずれも和光純薬工業 (株)) を使用した。

3. 結果ならびに考察

ラットの二糖類水解酵素活性は空腸上部で最も高く、下部に移行するに従って徐々に低くなり、回腸下部の比活性は空腸上部のその1/3以下になる。今回用いた小腸組織5標本は部位がバラバラで比活性が標本によって著しく異なるので平均値では示さず、それぞれの測定値を表2に示した。

スクラーゼ比活性は高い標本と低い標本で約7倍の差があり、イソマルターゼについても同様に活性の開きが見られた。マルターゼ比活性の標本による差異は高い標本と低い標本で3倍程度の差で、スクラーゼやイソマルターゼ比活性ほど大きくなかった。唯一、ラクターゼ活性が測定できたのは空腸下部の標本であったが、その比活性は非常に低く、スクラーゼ比活性の約1/30、マルターゼ比活性の1/100程度に過ぎなかった。ラクターゼ活性は空腸下部以外の標本では検出限界以下であった。

ヒト標本5例の平均小腸粘膜二糖類水解酵素比活性は、スクラーゼ 2.92 ± 1.99 、マルターゼ 13.31 ± 5.41 、イソマルターゼ 2.72 ± 1.60 、ラクターゼ 0.03 ± 0.09 、トレハラーゼ 0.49 ± 0.52 で、標本によるバラ

Table 2. Comparison of disaccharidase activities in small intestinal region of individual subject

Substrate	Subjects				
	Ileum (the end of distal)			Ileum (20cm upper from distal)	Jejunum (lower)
	A	B	C		
Sucrose	3.32 (1.0)	2.89 (1.0)	0.96 (1.0)	1.08 (1.0)	6.43 (1.0)
Maltose	16.59 (5.0)	15.28 (5.0)	5.90 (6.0)	8.30 (8.0)	20.5 (7.4)
Isomaltose	3.23 (2.0)	2.89 (1.0)	0.99 (1.0)	1.13 (1.0)	5.36 (0.96)
Lactose	N.D (-)	N.D.(-)	N.D (-)	N.D.(-)	0.21 (-)
Trehalose	0.23 (0.07)	0.14 (0.05)	0.30 (0.31)	0.25 (0.23)	1.52 (0.18)

Values are expressed μ moles of substrate hydrolyzed / mg protein / h, at 37°C, pH6.0.
N.D, couldn't be detectable. (Disaccharidase activity ratio vs. sucrase activity)

ツキが著しかった。これは採取した小腸部位が回腸や空腸であったためと考えられる。特に、ラクターゼ活性は回腸下部では極めて低く、検出限界以下であった。

スクラーゼ比活性を1.0とした時、マルターゼ比活性は平均6.28 (5~8)、イソマルターゼ比活性は1.19 (0.96~2) となり、各標本における3つの水解酵素活性の相対的な関係は比較的まとまっていた。すなわち、マルターゼ比活性はスクラーゼ比活性の6~7倍で、イソマルターゼ比活性はスクラーゼ比活性と同程度であることが理解できる。ラクターゼならびにトレハラーゼ比活性は検出限界以下または非常に低いために、他の水解酵素活性の相対的な関係は比較できなかった。

表3はヒト標本の中で唯一ラクターゼ活性が検出できたものと、ラット全小腸の粘膜二糖類水解酵素活性と比較したものである。ラットの二糖類水解酵素活性は小腸全体の平均になるのでヒトの活性と直接比較することはできないが、それぞれの酵素比活性はヒトの方がラットに比べて全体的に低い傾向を示した。しかし、ヒトとラットでオーダーが1~2桁も違うことはなく、比較的類似していた。ラットは小腸全体で、ヒトは空腸下部ということを考慮すると、ヒトとラットではもっと近似しているのかも知れない。さらに、スクラーゼ比活性を1.0とした時、ヒトではマルターゼ3.20、イソマルターゼ0.84、ラクターゼ0.03、トレハラーゼ0.23となり、ラットではマルターゼ5.36、イソマルターゼ1.88、ラクターゼ0.24、トレハラーゼ0.58となる。

Table 3. Comparison of disaccharidase activity ratio versus sucrase activity between human and rats small intestine

Substrate	Human (Average)	Human (lower jejunum)	Rats (Average)
Sucrase	1.0	1.0	1.0
Maltase	7.4	3.2	5.3
Isomaltase	0.96	0.84	1.8
Lactase	—	0.33	0.23
Trehalase	0.18	0.23	0.58

ラクターゼ活性はラットでも他の二糖類水解酵素に比べて低い、ヒトではそれ以上に低いことが明らかになった。これはヒト標本の年齢が平均64歳と高齢であることと関係しているのかも知れない。加齢に伴って二次性ラクターゼ欠損症が生じやすいことも事実である。若年者は牛乳や乳製品を食べる頻度が高いけれども、高齢者は食べる頻度が低いので、ラクターゼ活性が低いことも考えられる。

V. ラット小腸粘膜ラクターゼ活性におよぼす乳糖ならびに難消化性糖質馴化の影響

1. 研究目的

小腸二糖類水解酵素活性は基質誘導性があると考えられている³⁾。もしそうであるならば、乳糖を摂取させたラットにおいてラクターゼ活性は高くなることが考えられる。そこで、乳糖6%を含む飼料をラットに2週間摂取させ、小腸粘膜二糖類水解酵素活性に及ぼす影響を観察した。

2. 実験材料ならびに方法

1) 実験動物

Wistar系雄ラット (230-250g) 30匹をランダムに4群に分け、乳糖、ショ糖、フラクトオリゴ糖またはラクチトールを含む合成飼料で、14~18日間グループ飼育した (3~4匹/ケージ)。飼料および水は自由に摂取させ、実験に供する前には絶食させなかった。なお、飼育室の条件は室温23-25℃、湿度50~60%、室内照明は12時間サイクル (明期08:00~20:00、暗期20:00~08:00) であった。

2) 飼料組成

AIN-93組成飼料に準拠し、この飼料のショ糖6%をそれぞれの糖質で置換し、他の組成は同一とした。表4に各飼料組成を示した。

Table 4. Composition of the diet

Ingredient	Control (Sucrose diet)	Lactose diet	FOS diet	Lactitol diet
Cornstarch	465.692	465.692	465.692	465.692
Casein	140.000	140.000	140.000	140.000
α-cornstarch	195.000	195.000	195.000	195.000
Sucrose	60.000	0.000	0.000	0.000
Lactose	0.000	60.000	0.000	0.000
FOS	0.000	0.000	60.000	0.000
Lactitol	0.000	0.000	0.000	60.000
Soybean oil	40.000	40.000	40.000	40.000
Cellulose	50.000	50.000	50.000	50.000
Mineral mix	35.000	35.000	35.000	35.000
Vitamin mix	10.000	10.000	10.000	10.000
L-Cysteine	1.800	1.800	1.800	1.800
Choline bitartrate	2.500	2.500	2.500	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008

FOS: Fructooligosaccharide. Values are g / kg diet.

3) ラット小腸ホモジネートの調製

と殺後、直ちに盲腸を摘出し、その後小腸を取り出して縦に切り開き、生理食塩水で洗浄した。ティッシュペーパーで水滴を除去後、氷冷したガラスプレート上で粘膜を剥離し、生理食塩水で9%ホモジネートを作成した。これを適当に希釈して二糖類水解酵素活性の測定に用いた。

6) 小腸粘膜二糖類水解酵素活性の測定

IVで示したと同様に、二糖類水解酵素活性はglucose oxidaseを用いるDahlqvistの方法を改変した奥らの方法で測定した。各酵素比活性は μ moles of substrate hydrolyzed/mg protein/hrで表した。

3. 結果ならびに考察

乳糖、フラクトオリゴ糖、ラクチトールおよびショ糖含有飼料に馴化させたラット小腸粘膜二糖類水解酵素活性に及ぼす影響を観察した。難消化性オリゴ糖や糖アルコールを大量(15~20%)に含有する飼料でラットを飼育すると、盲腸が顕著に大きくなり、小腸粘膜二糖類水解酵素比活性は低下する。しかし、適当量(5%前後)難消化性糖質含有飼料で飼育すると小腸粘膜は肥厚して消化機能は亢進する。

本研究においても、難消化性糖質の摂取によってラット盲腸は肥大した。盲腸内容物を含めた湿重量が最も大きかったのは、ラクチトール群で、次はフラクトオリゴ糖群で、乳糖群はショ糖群とフラクトオリゴ糖群の間であった。すなわち、盲腸肥大から消化性を推定すると、乳糖は部分的に消化されることになる。特に気づいたことは、消化性のショ糖群の盲腸内容物が灰色またはどす黒い色をしていたことに対し、非消化性のラクチトール群およびフラクトオリゴ糖群は黄色またはオリーブ色をし、乳糖群の盲腸内容物の色は難消化性糖質群のそれに近かった。このことは、摂取した乳糖の一部が消化されずに大腸へ到達することを示唆している。盲腸内容物の色が摂取する糖質源で異なるのは、摂取する糖質によって腸内細菌叢が異なるためであると考えられる。さらに、盲腸内容物を取り出すときの臭いはショ糖群で強い悪臭を感じたが、乳糖群、ラクチトール群、フラクトオリゴ糖群では刺激性はなかった。乳糖群、ラクチトール群、フラクトオリゴ糖群では、有用菌であるビフィズス菌や乳酸菌が優性菌として生息していることを伺わせる。

表5は、それぞれの糖質を含有する飼料に2週間馴化させたラット小腸粘膜のラクターゼ、マルターゼならびにスクラーゼの比活性を示したものである。スクラーゼならびにマルターゼ比活性は難消化性のフラクトオリゴ糖(FOS)群、ラクチトール群および乳糖群で、消化性のショ糖群に比べてやや高くなる傾向を示したが、有意差は見られなかった。

ラクターゼ活性はスクラーゼ活性の5~6分の1、マルターゼ活性の24~29分の1に過ぎず、非常に低かった。ラクターゼ活性も乳糖ならびに難消化性糖質摂取によってごく僅かに高くなる傾向を示したが、有意差は見られなかった。乳糖摂取によるラクターゼ活性の誘導性が見られなかったのは、乳糖摂取期間が2週間と短かったためかも知れない。また、本実験においては、難消化性オリゴ糖による下痢を起こさせないために、飼料中の乳糖含量は難消化性オリゴ糖のそれに合わせて6%としたが、もっと多くする必要があったのかも知れない。さらに、離乳前から乳糖を摂取させることによって、離乳後の小腸ラクターゼ活性を高く維持することも考えられる。今後の検討課題である。

Table 5. Effect on lactase, sucrase and maltase activities of rat small intestinal mucosa by sucrose, lactose, and FOS-feeding

Disaccharide Feeding	Lactase (μ moles hydrolyzed substrate/ mg protein/h)	Sucrase	Maltase
Sucrose-feeding	3.31 \pm 0.55	17.4 \pm 4.37	79.6 \pm 13.6
Lactose-feeding	3.60 \pm 1.05	22.7 \pm 2.91	93.1 \pm 17.9
FOS*-feeding	3.50 \pm 0.84	24.2 \pm 8.42	101.9 \pm 8.4
Lactitol-feeding	3.71 \pm 2.01	22.2 \pm 3.10	103.2 \pm 14.7

FOS: Fructooligosaccharide.

Rats were fed with a diet containing 6% of sucrose, lactose, FOS or lactitol for 3 weeks. After decapitation, the mucosa of small intestine was homogenized in 9 volumes of 0.9% NaCl to assay disaccharidase activities by the modified method of Dahlqvist. Data were expressed M \pm S.D. of 5 rats.

VI. ラット腸内細菌による乳糖の発酵分解性におよぼす乳糖ならびに難消化性糖質による馴化の影響

1. 研究目的

ヒトに乳糖を摂取させると血糖上昇は極めて僅かで、呼気水素ガス排出量は難消化性糖質であるラクチトールやフラクトオリゴ糖よりも僅かに少ない程度で、消化吸収性糖質に比べて極めて多いことが明らかになった。このようにラクターゼ活性が低いにもかかわらず乳糖の最大無作用量が大きいのは、大腸へ到達した未消化の乳糖が腸内細菌によって速やかに発酵分解を受けることが考えられる。すなわち、現代の若い人は乳製品や難消化性糖質含有食品を摂取する機会が多くなっているため、乳糖を容易に資化する腸内細菌が増殖し、下痢に対する耐性ができていることが考えられる。

そこで、ラットへ乳糖、易消化性ショ糖、難消化性のフラクトオリゴ糖、または難消化性のラクチトールを含有する飼料で飼育し、その盲腸内容物を用いた培養実験において乳糖、ショ糖、フラクトオリゴ糖、ラクチトールの資化性を観察するとともに、資化性に及ぼす特殊な腸内細菌の同定を試みた。

2. 実験材料ならびに方法

1) 実験動物

Vの実験に用いた動物と同一である。

2) 各種糖質の資化性を検討するための盲腸内容物を用いた培養実験

各種糖質を含有した飼料で飼育したラット(2~4匹)をと殺後、直ちに盲腸を取り出し、その

内容物（8～10g）を5倍容量の60mM重炭酸－リン酸緩衝液（pH7.4、0.68 g/L L-ascorbic acidと1.3 g/L L-cysteineを含む）（w/v）に懸濁した。この懸濁液10mlをガラスフィルター付ガス洗浄ビン（14ml用）4本へそれぞれ分注し、これにショ糖、乳糖、フラクトオリゴ糖、またはラクチトール溶液（60mM重炭酸－リン酸緩衝液（pH7.4）を用いて100mg/mLに溶解したもの）1 mLを加え（全量11mL）、直ちに窒素ガスを通気（0.5mL/min）しながら室温（22～25℃）で5時間培養した。

反応開始後、0、1、2、3、4、5時間に培養液0.5mLを採取し、ポータブルpHメータ（D-21, HORIBA）を用いてpHを測定したのち23,000xg, 10 min（4℃）で遠心分離した。得られた上清をメンブランフィルター（Millipore 0.22 μm）でろ過後、HPLCを用いる短鎖脂肪酸の測定に用いた。

3) HPLCを用いた短鎖脂肪酸の測定

以下の条件で分析した。

HPLC装置	島津LC-10Av
Column	CAPCELL PAK C ₁₈ MG 4.6 mm id. X 250 mm (Shiseido)
Mobile phase	0.1 vol. % H ₂ PO ₄ :CH ₃ CN=97.5:2.5
Flow rate	1mL/min
Dtector	UV210nm
Column temp.	25℃
Sample volume	10 μL

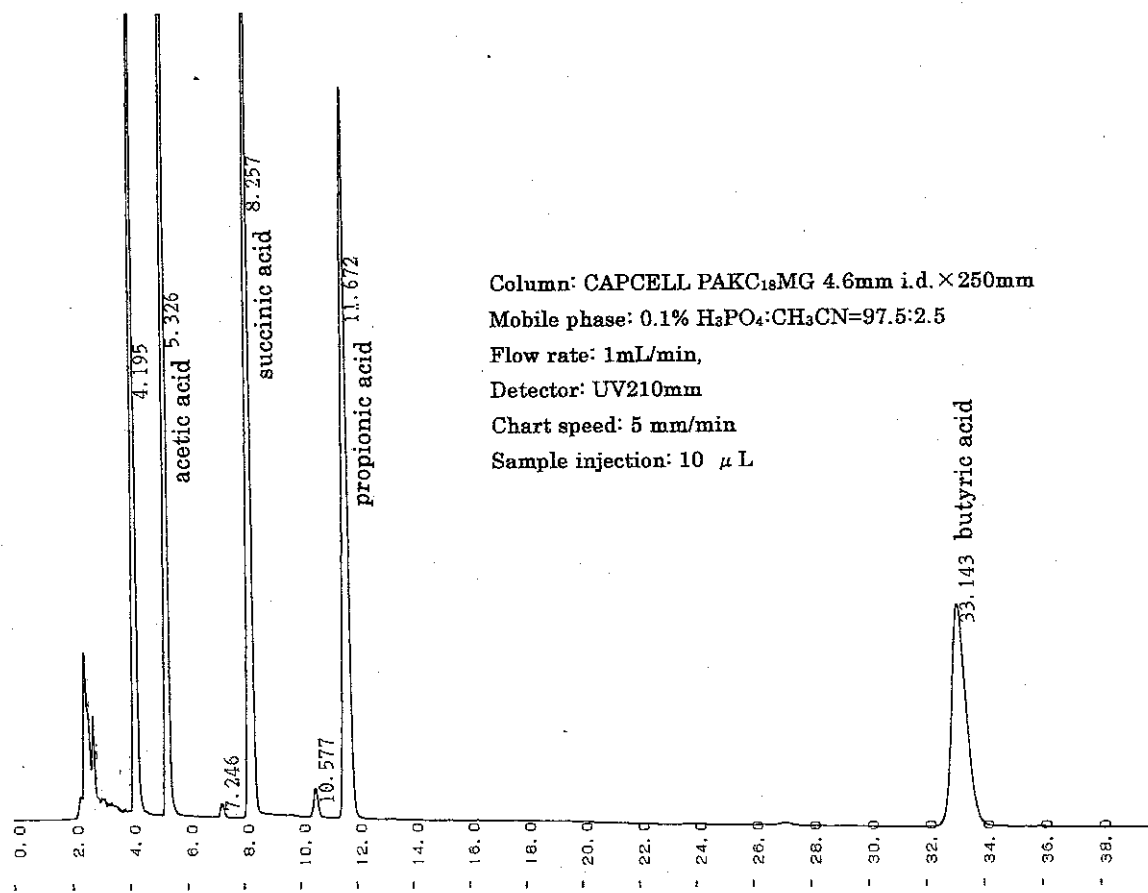


Fig. 11. Elution Profile of Short Chain Fatty Acids by HPLC

4) 腸内細菌の同定

盲腸内容物の細菌の同定は光岡らの方法によって行った¹³⁻¹⁴⁾。採取した盲腸内容物をよく混ぜた後、湿重量0.5gを秤量し、希釈液 (0.09% Agar in 0.9% NaCl) 4.5mLを加えて懸濁し (10-1希釈液)。10-1希釈液から10-8の希釈系列液を作成して、適当な希釈液から各50 μ Lを以下の寒天培地上に塗布した。

非選択培地としてBL寒天培地 (ニッスイ (株))、5種類の選択培地としてenterobacteria用にDHL寒天培地 (ニッスイ (株))、Lactobacilli用にLBS:BBL培地 (ニッスイ (株))、Clostridium perfringens用にCW寒天基礎培地 (ニッスイ (株))、Clostridia用にクロストリジア測定用培地 (ニッスイ (株))、Bacteroides用にバクテロイデス培地 (ニッスイ (株)) をそれぞれ用いた。DHL培地は37°C恒温器で好氣的に1日間、他の培地は嫌気パック (三菱ガス化学 (株)) へ入れて大気中の酸素を二酸化炭素に置換して37°C恒温器で嫌氣的に2日間培養した。盲腸内容物のサンプル採取から培地に塗布して培養を開始するまで3時間以内に行った。培養後の菌群の同定はコロニー性状、グラム染色、検鏡による菌形観察によって行った。

3. 結果ならびに考察

乳糖を6%含む飼料で14~18日間飼育したラットの盲腸内容物を用いて嫌氣的条件下で培養実験を行い、ショ糖、乳糖、フラクトオリゴ糖およびラクチールの発酵分解性を観察した。対照として消化性のショ糖を用いた。その結果を表6に示した。

表中の数値は、盲腸内容物懸濁液と基質液を混合した直後の短鎖脂肪酸濃度 (mmoles) を5時間反応後の短鎖脂肪酸濃度から差し引いたもので、言い換えると反応5時間に生成された短鎖脂肪酸量を示したものである。脂肪酸としては酢酸、プロピオン酸、酪酸およびコハク酸を定量し、これをmole数に換算して合計したものである。反応液のpHは5時間後のものである。短鎖脂肪酸は腸内細菌が基質である糖質を発酵分解することによって生成されるので、短鎖脂肪酸生成量が多いことはその基質となる糖質の発酵分解性が高いこと、すなわちその糖質を分解する腸内細菌が多く存在することを意味する。

ショ糖摂取群の糖質分解性は乳糖が最も低く、ラクチールが最も高かった。反応液pHの変化は短鎖脂肪酸の生成量にほぼ対応していたが、大きな変化は見られなかった。乳糖摂取群では、ショ糖の分解性が最も低く、乳糖の分解性が最も高かった。反応液pHは短鎖脂肪酸生成量が最も多かった乳糖を基質に用いた場合で最も低く、最も高かったのはショ糖を基質に用いた場合であった。

それぞれの基質の発酵分解性はいずれも乳糖摂取群の方が高く、ショ糖摂取群の方が低かった。特に、乳糖摂取群では乳糖およびフラクトオリゴ糖の分解性がショ糖摂取群よりも高かった。

反応液pHが、5時間の反応によって短鎖脂肪酸が反応液中に生じたにも拘わらず、僅かしか低下せず、逆に反応前より高くなったものもあった。これは反応液に用いた重炭酸ナトリウム緩衝液を窒素ガスでバブリングしたために炭酸が抜けたためと考えられる。窒素ガス流量はflow meterを各培養系ごとに取り付けてできるだけ均一にしたが、流量が極めて少ないために微量調整ができなかったこと

も事実である。この窒素ガス流量がpHに影響している可能性もある。

糖質の発酵分解性は乳糖摂取群で高かったが、これは摂取した乳糖の一部が未消化の形で大腸に到達し、腸内細菌が増殖するためのエサとして利用され、細菌数が増加したためではないかと考える。本研究においても乳糖摂取による腸内細菌叢の変化の観察を試みたが、提示できるデータを得るには至らなかった。しかし、乳酸菌とビフィズス菌が乳糖摂取によって増加する傾向が観察されている。すでに述べたように、乳糖摂取群の盲腸がショ糖摂取群に比べて明らかに大きかったことは、乳糖が盲腸に到達することを示しており、腸内細菌が増加していることを支持している。

先のヒトを用いた実験において、乳糖の一過性下痢に対する最大無作用量が他の難消化性オリゴ糖（例えば、フラクトオリゴ糖）などに比べて著しく高いにもかかわらず、ラクターゼ活性が低いことが明らかになった。その要因として、乳糖を特異的に発酵分解する腸内細菌が増加していることを指摘した。本研究はラットを用いた実験であるが、乳糖摂取によって乳糖の分解性が難消化性オリゴ糖の発酵分解性より亢進することが示された。これらの結果は、牛乳および乳製品を多く摂取しているヒトにおいては、乳糖分解菌が大腸に定着しているために下痢をしにくくなっていることを示唆している。

Table 6. Effect of lactose or sucrose feeding on SCFA production from sucrose, lactose, FOS and Lactitol by rat cecal microflora

Substrates	Sucrose-feeding		Lactose-feeding	
	Total SCFAs Produced (mmol) after 5 h	pH	Total SCFAs produced (mmol) after 5 h	pH
Sucrose	9.61	7.58	13.80	7.45
Lactose	7.40	7.69	29.11	6.95
FOS*	16.51	7.37	22.05	7.21
Lactitol	19.06	7.31	21.58	7.28

FOS: Fructooligosaccharide, SCFA: short chain fatty acid.

Rats were fed with a diet containing 6% of sucrose or lactose for 2 weeks. After decapitation, the cecal contents of 2 or 3 rats were suspended in 5 volumes of phosphate-bicarbonate buffer (pH7.4) containing 50 mmol/L KH_2PO_4 , 60 mmol/L NaHCO_3 , 0.68g/L L-ascorbic acid, 1.3 g/L L-cysteine, 75 mmol/L NaCl, and 10 g/L sucrose or lactose. 10 mL of the cecal contents suspension was put in a special apparatus and cultivated for 5 h, at 25°C under N_2 gas (flow rate: 3 mL/min). 1 mL of the suspension was removed and centrifuged at 23,000×g, 10 min at 4°C. After filtration of the supernatant with 0.22 μ m membrane filter (Millipore, Ireland), short chain fatty acids were determined with HPLC (Column: CAPCELL PAKC₁₈MG 4.6mm i.d.×250mm, Mobile phase: 0.1% H_3PO_4 : CH_3CN =97.5:2.5, Flow rate: 1mL/min, Detector: UV210mm). pH was measured with a handy pH meter (HORIBA, Tokyo). Data were expressed as means of 3 determinations.

VII. 引用文献

- 1) Oku T.: Comparison of digestibility and its mechanism of several oligosaccharides and sugar alcohols. Proceeding of IUFoST 196 Regional Symp. on Non-nutritive health Factors for Future Foods. Pp.518-521(1997).
- 2) Rubino A., Zimbalatti F., and Auriccio S.: Intestinal disaccharidase activities in adult and suckling rats. *Biochim Biophys Acta* 92:305-311(1964)
- 3) Goda T, Koldvsky O.: *World Review of Nutrition and Dietetics* (Bourne GH. Ed.), Vol.57 p.275 (Karger, Basel).
- 4) 光岡知足：腸内のドラマ、ヤクルト本社(1981).
- 5) 奥 恒行：ヒトにおける乳糖の一過性下痢に対する最大無作用量とそれに及ぼす食べ方に関する研究。平成13年度牛乳栄養学術研究会委託研究報告書。全国牛乳普及協会、牛乳製品健康づくり委員会。
- 6) Kunst A., Draegar B., and Ziegenhorn J.: Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd eds. Vol. , , ed. Berbmeyer. Pp 178-185. Weinheim: Verlag Chemie (1984).
- 7) Liversey JH, Hodgkinson SC, Round HR, Donald RA.: Effect of time , temperature and freezing on the stability of immunoreactive LH, FSH, TSH, growth hormone, prolactin and insulin in plasma. *Clin Biochem* 13:151-155(1980).
- 8) Oku T. and Nakamura S.: Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. *Pure Appl Chem* 74:1253-1226(2002).
- 9) Oku T. and Nakamura S.: Estimation of intestinal trehalase activity from a laxative threshold of trehalose and lactulose on healthy female subjects. *Eur J Clin Nutr* 54:783-788(2000).
- 10) Dalqvist A.: Method for assay of intestinal disaccharidase. *Anal Biochem* 7:18-25(1964).
- 11) Oku T., Konishi F., and Hosoya N.: Mechanism of inhibitory effect of unavailable carbohydrate on intestinal calcium absorption. *J Nutr* 112:410-415(1982).
- 12) Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254(1976).
- 13) Mitsuoka T, Sega T, Yamamoto S.: Eine vertesserte methodik der qualitativen und quantitativen analyse der darmflora von menschen and tieren. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 1Abt Orig A* 195:455-469(1965).
- 14) Mitsuoka T, Ohno K, Benno Y, Suzuki K, Namba K.: Die Faekafloora bei menschen. V Meeting: Vergleich des neu entwickelten verfahrens mit dem bishrigen ublichen verfahren zur darmflora analyse. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 1Abt Orig A* 234:219-233(1976).
- 15) 光岡知足：腸内細菌の世界。叢文社 (1984).