

博士学位論文（課程外）

多様な集団・環境におけるプロバイオティクス
乳酸菌の機能性評価に関する研究

2020 年 7 月

【研究分野・紹介教授】

食品科学・熊澤 義之 教授

酒井 隆史

東京薬科大学

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	新規な乳酸菌鑑別用選択培地の性能評価およびラクトバチルス・カゼイ・シロタ株 (LcS) の消化管生残性評価	5
2.1	緒言	5
2.2	材料および方法	7
2.3	結果	13
2.4	考察	19
第 3 章	便秘症状に関する精度の高い評価手法の導入および LcS の機能性評価	21
3.1	硬めの便の排出頻度に基づく評価手法の導入および便が硬めの健常成人を対象とした LcS 発酵乳の飲用効果検証	21
3.1.1	緒言	21
3.1.2	材料および方法	25
3.1.3	結果	31
3.1.4	考察	39
3.2	便秘症状や便秘に伴う生活の質の評価手法導入および産褥期の女性を対象とした LcS 発酵乳の飲用効果検証	42
3.2.1	緒言	42
3.2.2	材料および方法	43
3.2.3	結果	49
3.2.4	考察	57
第 4 章	国際宇宙ステーション船内環境における LcS の機能性への影響評価	60
4.1	緒言	60
4.2	材料および方法	61
4.3	結果	65
4.4	考察	80
第 5 章	総括	83
引用文献	89
乳酸桿菌の分類表記について	101
謝辞	102

略号一覧

ANCOVA	analysis of covariance
BMI	body mass index
BSFS	Bristol Stool Form Scale
CCQ	Chinese Constipation Questionnaire
CFU	colony forming unit
CMR	circular medium-sized red
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAS	full-analysis set
GCP	Good Clinical Practice
GEE	generalized estimating equation
HPLC	high performance liquid chromatography
IL-12	interleukin 12
ISS	International Space Station
LcS	<i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota
LLV	lactitol-LBS-vancomycin
MRS-V	MRS-vancomycin
M-RTL	modified-rhamnose-2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-LBS-vancomycin
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NK	natural killer
PAC-QOL	Patient Assessment of Constipation Quality of Life
PAC-SYM	Patient Assessment of Constipation Symptom
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMA	propidium monoazide
PTP	press-through-package
QoL	quality of life
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
VBNC	viable but non-culturable
WHO	World Health Organization

第 1 章 序論

微生物とヒトの健康との関わりについて研究が始まったのは 19 世紀後半から 20 世紀前半のことである。フランスの小児科医 Henry Tissier は、1899 年に母乳保育されていた乳幼児の糞便からビフィズス菌を分離することに成功し、健康なヒトの腸内にビフィズス菌が最優勢に存在することを明らかにした (1)。免疫学研究で 1908 年にノーベル生理学・医学賞を受賞したロシアの研究者 Ilya Metchnikoff は、長寿者の多いブルガリアに住む人々がヨーグルトを常食していることに着目し、ヨーグルトに含まれる乳酸菌により腸内の腐敗菌の働きが抑えられ、老化の抑制につながるのではないかと考えた。この「ヨーグルト不老長寿説」は、1907 年に発行された著書 “The Prolongation of Life” に記されており (2)、プロバイオティクスの概念の礎となっている。

プロバイオティクスは、ラテン語 “pro” とギリシア語 “bios” を組み合わせた “for life” を意味し、1965 年に Lilly と Stillwell によって初めて提示された (3)。1989 年に英国の微生物学者 Roy Fuller は、「腸内フローラのバランスを改善することにより人に有益な作用をもたらす生きた微生物 (a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance)」とプロバイオティクスを定義した (4)。その後、2001 年に国際連合食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization of the United Nations : FAO) / 世界保健機関 (World Health Organization : WHO) 共同の専門家ワーキンググループにより「十分量を摂取したときにヒトに有益な効果をもたらす生きた微生物 (live microorganisms which, when administered in adequate amount, confer a health benefit to the host)」という定義が提唱され (5)、2002 年には食品に使用されるプロバイオティクスの評価に関するドラフトガイドラインをまとめた (6)。2014 年、国際プロバイオティクス・プレバイオティクス学術機関 (the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) の専門家パネルメンバーにより、FAO/WHO 定義の文法的な修正 (live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host) が加えられた (7)。

昨今、プロバイオティクスを含む数多くの製品が市場に流通しており、発酵乳やヨーグルトをはじめ、ジュース、サプリメントおよび医薬品など、その形態は多岐にわたる。プロバイオティクスとして主に乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) やビフィズス菌 (*Bifidobacterium*) が用いられているが、特定の大腸菌 (*Escherichia coli*) 株や酵母 (*Saccharomyces* spp.) など含まれる。これまでに、腸内細菌叢 (腸内フローラ) の正常化を含む整腸作用、感染起因菌や日和見感染菌の作用を抑える感染防御、ヒトの免疫機能の働きを

サポートする免疫賦活、抗炎症、抗アレルギー、抗肥満作用など、プロバイオティクスの多種多様な機能性に関する研究成果が報告されている（7-10）。プロバイオティクスの機能性や効果の程度は菌株によって異なり、その評価も菌株レベルで実施することが求められている。

ラクトバチルス・カゼイ・シロタ株 (*Lactobacillus casei* strain Shirota : LcS) は、80 年以上前に日本国内で代田稔博士により見出されたグラム陽性、通性嫌気性の乳酸桿菌であり、代表的なプロバイオティクス株の一つとして知られている（11）。1935 年に LcS を含む発酵乳飲料（LcS 発酵乳）が日本国内で製品化されて以来、安全な食品素材として利用されてきた。また、日本国内で実施された対人試験により、摂取した LcS が胃酸・胆汁酸に耐えて生きて腸まで到達する、腸内細菌叢や腸内環境を正常化する、便秘症状や便通を改善するなどの整腸作用が確認されている（12-14）。また、LcS は単球・マクロファージに取り込まれ、ナイーブ T 細胞の Th1 細胞への分化を促すサイトカインであるインターロイキン 12 (interleukin 12 : IL-12) の産生を誘導し、外敵から身体を守る役割をもつ自然免疫細胞であるナチュラルキラー (natural killer : NK) 細胞の活性を高めることが報告されている（15, 16）。さらに、NK 細胞活性の低下した人が LcS 発酵乳を継続飲用することにより、NK 細胞活性が高まり正常化することが確認されている（17-20）。これらの LcS の機能性に着目した臨床研究や疫学研究も実施されており、その長期摂取が大腸腺腫の異型進行を抑えて大腸がんの発症リスクを低減すること（21）、膀胱がんの発症／再発リスクを低減すること（22, 23）、乳がんの発症リスクを低減すること（24）が報告されている。免疫機能が低下する高齢者における感染症のリスク低減も確認され、高齢者施設入居者やデイケア施設に通う高齢者が LcS 発酵乳を継続飲用することにより、有病日数や発熱期間が短縮されることが示されている（25-27）。近年では、脳と腸の働きがお互いに影響を及ぼし合うという脳腸相関に着目した LcS の機能性研究も進められている。学術試験を控えた医学部生を対象とした試験にて、LcS 発酵乳の継続飲用により試験に伴うストレスが緩和されることが、深い眠りによる熟眠度が高まり、起床時の眠気を改善することが確認されている（28-30）。

LcS を利用した製品は、日本のみならずアジア・オセアニア地域、欧州地域、米州地域の世界各国に展開されている。日本国内で積み重ねられてきた対人試験の実績から、日本国外でも人々の健康管理に LcS を役立てていくことが期待される。一方、食習慣を含む生活習慣、生活環境は地域や国によって大きく異なり、多様性に富んでいる。世界の人々の健康管理に貢献するためには、多様な集団、環境にて LcS の機能性が発揮されることを科学的に証明していくことが求められる。一方、LcS の機能性評価の手法は主に日本国内での経験・知見に基づいて構築されており、日本以外の地域・環境で生活

する人々にも適用可能な評価手法の導入が課題であった。

日本と異なる地域において LcS の機能性評価を行うためには、生活習慣や生活環境の違いを踏まえ、目的に合致した評価手法を採用する必要がある。LcS 製品が流通している地域の一つとして欧州地域が挙げられる。欧州地域は古くから酪農が盛んであり、チーズやヨーグルトといった発酵乳製品も豊富である。現地に居住する人々は日常的に発酵乳製品を摂取しており、腸内細菌叢もその食生活の影響を受けていると考えられる。

プロバイオティクスは生きて腸まで届き、有機酸産生等の代謝活動を行うことにより、感染防御、腸内環境の改善、消化管蠕動運動の亢進、腸管バリア機能の増強等の機能を発揮することが示唆されている（7, 31, 32）。LcS が様々な地域の人々に対してその機能性を発揮し得ることを示すため、現地の人々を対象とした試験にて、まず LcS の消化管生残性を検証する必要がある。その消化管生残性を検証する際、LcS を摂取したヒトの糞便を選択培地で培養し、生育した菌数を測定する。しかし従来の選択培地を用いた場合、欧州地域で流通している発酵乳製品にも含まれ、この地域に居住するヒトの糞便からの検出が報告されている *Lactobacillus rhamnosus* が LcS と類似のコロニーを形成するため、欧州地域での LcS の消化管生残性評価の阻害要因となり得ることが課題であった。そこで第一の研究として、コロニー形態により LcS と *L. rhamnosus* を見分けることができる新規な選択培地である modified-rhamnose-2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-LBS-vancomycin (M-RTLTV) 寒天培地の性能評価を行い、この培地を用いて西欧の中心的位置にあるベルギーに居住する人々を対象とした LcS の消化管生残性評価を行った（33）。

地域性に適した評価手法を必要とするケースがある一方、世界各国で共通の健康課題に対する LcS の機能性を評価するためには、地域を問わず普遍性の高い評価手法を適用することが望まれる。便秘は、世界の人々の 10～30% 程度が症状を感じており、その感じ方や捉え方が個々で異なる主観性の高い健康課題である。また、症状に関する表現も国や地域、言語によって異なる。LcS は生きて腸まで届いて代謝活動を行うことにより、消化管の蠕動運動を促し、便秘関連症状の緩和に寄与すると期待される。しかし、これまでの試験において便秘関連症状の評価手法は統一されておらず、標準的な手法の構築・導入が課題であった。そこで第二の研究として、多様な地域に適用可能であり、便秘症状や便通に対する LcS の機能性評価に適した評価手法の検討を行った（34, 35）。

また、一般の生活環境と著しく異なる特殊環境で生活する人々の健康管理にも LcS を活用することが期待される。国際宇宙ステーション (International Space Station : ISS) に滞在する宇宙飛行士は、微小重力、宇宙放射線、閉鎖

空間など地球には無い複合的なストレス環境下で生活する中、免疫機能が低下することが報告されている。この健康課題に対し、身体免疫細胞の半数以上が存在する腸の環境を整え、NK細胞の活性化など免疫機能の維持・活性化に効果を発揮することが知られている LcS を活用できるのではないかと考え、宇宙飛行士が ISS 船内で摂取する宇宙実験に着手した。一方、ISS 船内および ISS に物資を届ける補給船内は冷蔵保管できるスペースが限られる等の制約があり、発酵乳製品の利用は困難と考えられたことから、凍結乾燥した LcS を含むカプセル形態の宇宙実験用の試験サンプルが開発された。ISS に滞在する宇宙飛行士が摂取しても LcS が生きて腸に届き、腸内環境を整えて免疫機能の維持・活性化に効果を発揮するためには、ISS 船内環境でも LcS の機能が安定的に維持されることが求められる。そこで第三の研究として、宇宙実験用の試験サンプルを ISS 船内で約 1 か月間保管し、LcS の生菌数、代謝機能、免疫調節作用に関する機能等、LcS 機能の安定性評価を行った (36)。

一連の研究により LcS の機能性を適切に評価するための基盤を構築し、様々な地域・環境で生活する人々に対する LcS の有効性を科学的に証明していくこと、そしてエビデンスに基づく信頼性の高い製品を提供して広く世界の人々の健康管理に貢献していくことを目指す。また、LcS 以外のプロバイオティクス研究や微生物研究、臨床研究等にも幅広く利用できる知見を獲得し、今後の研究発展に貢献する。

第 2 章 新規な乳酸菌鑑別用選択培地の性能評価および LcS の消化管生残性評価

2.1 緒言

食道、胃および十二指腸から構成される上部消化管は、食物を消化する重要な役割を担っている。胃液で満たされ著しく pH の低い胃、膵液や胆汁酸の影響を受ける十二指腸は微生物にとってストレスの高い環境である。微生物が大腸をはじめとする下部消化管にて生理活性を示すためには、上部消化管のストレス環境に耐えて生き残る必要がある。

プロバイオティクスは「十分量を摂取したときにヒトに有益な効果をもたらす生きた微生物」と定義される (5-7)。プロバイオティクスは消化管内で有機酸等を産生して腸内環境を改善すること (7)、ビフィズス菌等の腸内細菌の増殖、短鎖脂肪酸やペプチド等の産生を促進することにより消化管の蠕動運動が亢進し、便秘症状の改善に寄与すること (31)、代謝産物を介した病原性細菌の抑制や腸管上皮細胞のタイトジャンクション増強により腸管バリア機能の維持に寄与すること (32) が示唆されている。これらのことから、プロバイオティクスが機能を発揮するためには、下部消化管まで生きて届いて代謝活動を行うことが必要と考えられる。

プロバイオティクスが下部消化管に届くことを証明する方法として、侵襲なく採取できる糞便を用い、その中から摂取したプロバイオティクス菌株の検出の有無を確認し、菌数を測定する方法が一般的である。従来、その測定には選択培地を用いた培養法が採用されていた。一方、測定技術の進展により、培養に依存しない測定手法として蛍光染色 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (fluorescent *in situ* hybridization : FISH)、定量的 PCR 法 (quantitative polymerase chain reaction : qPCR)、逆転写-PCR 法 (reverse transcription PCR : RT-PCR)、フローサイトメーターを用いた蛍光活性化セルソーティング法 (fluorescence-activated cell sorting : FACS) が開発されてきた。また、「生きている」ことの定義として、培養法によりコロニーを形成する (culturable) だけでなく、コロニー形成能は無くとも細胞膜が維持され、代謝能など菌の特性を保っている「生きているが培養できない (viable but non-culturable : VBNC)」状態が含まれることも提唱されている。VBNC も測定対象とすべく、細胞膜不透過性であり細胞膜が維持された菌には影響せず、細胞膜が損傷した菌に入り込んで DNA を化学修飾して PCR 反応を阻害する特徴を持つ propidium monoazide (PMA) を利用した PMA-PCR 法も開発されている (37)。培養法は結果が出るまでに時間を要する、操作に熟練を要する、自動化が困難である等のデメリットがあり、上記の培養によらない技術の活用が期待さ

れている。一方で、培養法は「生きている」ことを確実に証明できる方法として、依然としてその有用性は支持されている。

LcS は、胃酸および胆汁酸に耐性を示すことが報告されている。モデル実験系を用いた過去の研究にて、LcS 生菌が腸内で酢酸や乳酸などの有機酸を産生することによりサルモネラ感染を抑制すること、加熱処理し死菌化した LcS には感染抑制効果が認められないことが報告され (38)、生きて腸に届くことの重要性が示されている。これまで日本国内では、LcS の消化管生残性を評価するため、LcS を摂取した被験者の糞便を採取し、糞便中の最優勢菌群の生育を抑えられる選択培地である lactitol-LBS-vancomycin (LLV) 寒天培地を用いて培養を行っていた (12-14)。この培地では、炭素源としてラクチトール (lactitol)、抗生物質としてバンコマイシン (vancomycin) 用いている。すなわち、ラクチトールを資化し、バンコマイシンに耐性を有する菌は生育可能な培地であり、LcS の類縁種である *L. casei*、*Lactobacillus paracasei* および *L. rhamnosus* を培養すると LcS に類似のコロニーを形成する。LcS 以外にこれらの菌が糞便中に含まれている場合、コロニー形態で LcS と見分けることが困難となり、消化管生残性評価に影響を及ぼす可能性がある。特に欧州地域は古くから酪農が盛んであり、チーズやヨーグルトといった発酵乳製品も豊富である。欧州で流通している製品の中には *L. rhamnosus* を含むものもあり (39)、現地に居住する人々は日常的に発酵乳製品を摂取していることから、腸内細菌叢もその食生活の影響を受けている可能性がある。実際に、欧州に居住するヒトの糞便から *L. rhamnosus* が検出されたことが報告されている (40)。

L. casei/L. paracasei と *L. rhamnosus* の違いとして、L-ラムノースの資化性が挙げられる。*L. rhamnosus* は L-ラムノースを炭素源として利用し、乳酸を産生するのに対し、*L. casei/L. paracasei* はこれを利用することができない。Nagasaki らは、還元時に triphenylformazan の赤色沈殿を生じる酸化還元指示薬である 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) の性質に着目し、乳酸菌による糖資化性を評価するため改良 MRS 培地に TTC を加えた寒天培地を開発した (41)。乳酸菌が糖を利用できる場合は乳酸を産生し、酸性条件では TTC の還元による呈色反応が抑えられるため、白色または薄い赤色のコロニーを形成する。一方、糖の資化能が無い場合は TTC が還元され、赤色のコロニーを形成する。

これらの知見を基に開発された、L-ラムノースと TTC を利用した新規な選択培地である M-RTLTV 寒天培地による *L. casei/L. paracasei* と *L. rhamnosus* の識別能の評価および LcS の消化管生残性評価を行った。

2.2 材料および方法

使用菌株

L. casei DSM 20011^T、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081^T、*L. paracasei* subsp. *paracasei* に属する 6 菌株（DSM 5622^T、DSM 8741、DSM 20006、DSM 20008、DSM 20020、DSM 20244）および *L. rhamnosus* に属する 9 菌株（DSM 20021^T、DSM 8743、DSM 8744、DSM 8745、DSM 8746、DSM 20022、DSM 20245、DSM 20247、DSM 20711）は DSMZ GmbH（ブラウンシュヴァイク、ドイツ）より購入した。*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356^T、*Lactobacillus brevis* ATCC 14869^T、*Lactobacillus fermentum* ATCC 14931^T、*Lactobacillus fructivorans* JCM 1117^T、*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T、*Lactobacillus reuteri* JCM 1112^T、*Lactobacillus ruminis* JCM 1152^T、*Lactobacillus sakei* JCM 1157^T および LcS はヤクルト中央研究所（東京）のカルチャーコレクションより入手した。

接種用菌液の調製

Lactobacillus 属の各菌株は MRS 培地（Becton Dickinson and Company、フランクリン・レイクス、米国）を用いて培養した。AnaeroGen (Oxford Limited、ハンプシャー、英国) および AnaeroPack Rectangular Jar（三菱ガス化学株式会社、東京）を使用し、37℃にて 48～72 時間培養した。

培地調製

M-RTLTV 寒天培地の組成を Table 2-1 に示す。培地は 1N の HCl を用いて pH6.0 に調整し、沸騰水中で 30 分間煮沸することによって滅菌した。L-ラムノース溶液（0.4 g/mL）、バンコマイシン溶液（10 mg/mL）、メトロニダゾール溶液（10 mg/mL）および TTC 溶液（30 mg/mL）は、ろ過滅菌を行った。プレートに分注する直前に、L-ラムノース溶液 50 mL、バンコマイシン、メトロニダゾール、TTC の各溶液 1 mL を培地液に加えた。MRS-バンコマイシン（MRS-vancomycin : MRS-V）寒天培地は、Tharmaraj と Shah の方法（42）に従い調製した。全ての寒天培地プレートは安全キャビネット内で 10 分間乾燥させた。

菌数検査

各菌株の接種用菌液はリン酸緩衝食塩水（phosphate buffered saline : PBS）を用いて段階希釈し、寒天培地プレート上に塗抹した。接種後のプレートは、AnaeroGen および AnaeroPack Rectangular Jar を用いて 37℃で 72 時間嫌気培養した。コロニーが 25 個から 250 個出現したプレートを選択し、コロニー

数を測定した。少なくとも 2 回の独立した実験により、コロニー形態を確認した。

M-RTLTV 寒天培地と MRS-V 寒天培地による菌数測定能の比較

L. rhamnosus DSM 20021^T の培養液と LcS、*L. casei* DSM 20011^T または *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM 5622^T の培養液を 1:1、1:3 および 3:1 の比で混合し、PBS にて 10⁶ 倍希釈した。これら混合希釈液を M-RTLTV 寒天培地および MRS-V 寒天培地に塗抹した。MRS-V 寒天培地の場合はデュプリケートとし、一つは 37℃、もう一つは 43℃で培養した。M-RTLTV 寒天培地は 37℃で培養した。M-RTLTV 寒天培地では、各菌株を単一培養した際のコロニー形態を参照した。赤い斑点が中心にあり、大きい（2～3 mm 程度）円形の白色コロニーを *L. rhamnosus*、中程度の大きさ（1～1.5 mm 程度）の赤色コロニーを *L. casei* および *L. paracasei* と判定した。MRS-V 寒天培地では、*L. rhamnosus*、*L. casei* および *L. paracasei* は 37℃では全て生育するのに対し、43℃で生育できるのは *L. rhamnosus* のみである。*L. casei* および *L. paracasei* の菌数は、37℃で出現したコロニー数から 43℃で出現したコロニー数を差し引くことで推定した。M-RTLTV 寒天培地、MRS-V 寒天培地共に 2 連で測定を行った。

健常成人を対象とした LcS 発酵乳の飲用試験

Drug Research Unit Ghent（ゲント、ベルギー）が募集したベルギーに居住する 18～65 歳の健常成人男女 20 名を本飲用試験の被験者とした。試験の実施に先立ち、Ghent University Hospital の倫理審査委員会による承認を受けた。全ての被験者から同意書への署名を受けた。本試験はヘルシンキ宣言の主旨、Good Clinical Practice（GCP）その他の法令を遵守して実施した。被験者の除外基準は次のとおりとした：①選択基準の年齢に該当しない者、精神的あるいは法的に十分な能力を有していない者 ②過敏性腸症候群、クローン病などの慢性的な腸管障害の既往を有する者 ③飲用開始 2 週間前から飲用期間中に治療を中止できない者、あるいは治療を行うことが予期される者（処方薬、非処方薬、ビタミンおよびハーブサプリメントを含む、ただしパラセタモール、経口避妊薬およびホルモン療法は除く）④麻薬中毒、アルコール中毒の既往がある者。

被験者を試験飲料 A 群および試験飲料 B 群にランダムに割り付けた。試験飲料 A として現地で市販されている Yakult、試験飲料 B として現地で市販されている Yakult Light を使用した（Table 2-2）。両飲料は、Yakult Europe B.V.（アルメア、オランダ）より提供された。

本飲用試験は、1 週間の前観察期間と 1 週間の飲用期間のスケジュールに

て実施した (Fig. 2-1)。試験期間中、被験者に対して試験飲料を除くプロバイオティクス製品の摂取を控えるよう指導した。試験 8 日目の飲用開始前、被験者自身が採便チューブ (SARSTEDT、ニュームブレヒト、ドイツ) に糞便を採取し、保冷剤を同梱して冷蔵状態を維持したまま試験実施施設である Drug Research Unit Ghent へ持参した。糞便検体を引き渡した後、被験者は試験飲料 7 本と新しい採便用資材を受け取り、飲用期間中に毎日 1 本試験飲料を飲用した。飲用完了後、被験者は再度糞便を採取し、試験実施施設に持参した。採便日当日に排便が無い場合、最大 2 日間の採便遅延を認めた。

糞便に含まれる LcS の同定および菌数測定

被験者から提出された糞便を秤量した後、嫌気グローブボックス (5% CO₂、4% H₂、91% N₂) へ移し、嫌気用希釈バッファーに 1:9 (w:v) の比率で加えて懸濁した。糞便は薬さじで押しつぶし、ボルテックスミキサーで均一化した。この懸濁液を同じバッファーで段階希釈し、M-RTL⁺V 寒天培地に接種し 37℃で 72 時間嫌気培養した。培養後、LcS を含む *L. casei*/*L. paracasei* 様の円形、中程度の赤色 (circular medium-sized red : CMR) コロニーの数を測定し、Yuki らの方法 (12) に従って CMR コロニーの一部を LcS 特異的モノクローナル抗体 L8 を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) に供した。その結果、陽性と判定されたコロニーを LcS とし、CMR コロニー数に陽性率を乗じて LcS の菌数を算出した。

Table 2-1. M-RTL^V 寒天培地の組成

トリプチケースペプトン	10 g
酵母エキス	5 g
リン酸二水素カリウム	6 g
クエン酸三アンモニウム	2 g
ツイーン 80	1 g
酢酸ナトリウム三水和物	25 g
Bacto agar	20 g
バンコマイシン塩酸塩	10 mg
メトロニダゾール	10 mg
2,3,5-triphenyltetrazolium chloride	30 mg
L-ラムノース	20 g
Salt solution ^a	5 mL
精製水	950 mL

^aSalt solution 組成

硫酸マグネシウム七水和物	11.5 g
硫酸鉄(II)七水和物	0.68 g
硫酸マンガン(II)四水和物	2.4 g
精製水	100 mL

Table 2-2. 試験飲料 1 本当たりの組成

	試験飲料 A	試験飲料 B
容量 (mL)	65	65
LcS 生菌数 (CFU)	$\geq 6.5 \times 10^9$	$\geq 6.5 \times 10^9$
エネルギー (kcal/kJ)	48.4/202.5	27.3/114.2
脂肪分 (g)	< 0.1	< 0.1
炭水化物 (g)	11.2	6.6
タンパク質 (g)	0.9	0.9

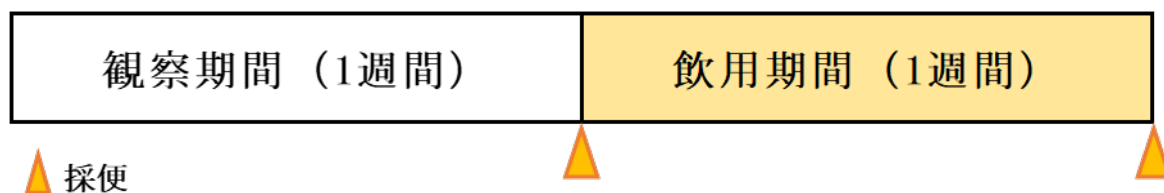


Fig. 2-1. 飲用試験スケジュール。

2.3 結果

M-RTLTV 寒天培地上に生育する *Lactobacillus* 属菌株のコロニー形態

Lactobacillus 属の 26 菌株を M-RTLTV 寒天培地で培養したところ、*L. casei*、*L. paracasei* および *L. rhamnosus* に属する全ての菌株を含む 21 株がコロニーを形成し、5 株は生育しなかった (Table 2-3)。*L. casei* と *L. paracasei* の各菌株は赤色のコロニーを形成したのに対し、*L. rhamnosus* の各菌株は赤い斑点のある白色コロニーまたはピンク色のコロニーを形成した。これら以外の菌株では、*L. plantarum* ATCC 14917^Tのみ *L. casei*/*L. paracasei* と類似の赤色コロニーを形成した。*L. fermentum* ATCC 14931^T、*L. reuteri* JCM 1112^Tおよび *L. sakei* JCM 1157^Tは微小コロニーを形成し、*L. casei*、*L. paracasei* および *L. rhamnosus* とは明確に異なっていた。

L. casei/*L. paracasei* と *L. rhamnosus* が混在する場合の M-RTLTV 寒天培地での識別性および MRS-V 寒天培地との菌数測定能の比較

LcS と *L. rhamnosus* DSM 20021^Tの混合希釈液を M-RTLTV 寒天培地にて培養した例を Fig. 2-2 にて示す。両者は、色調をはじめとするコロニー形態の違いにより、同一の M-RTLTV 寒天培地プレート上で明確に識別することができた。LcS 以外の *L. casei*/*L. paracasei* と *L. rhamnosus* の組合せでも同様に識別することが可能であった。*L. casei*/*L. paracasei* と *L. rhamnosus* の混合比を 3 段階に分け、M-RTLTV 寒天培地上でのコロニー形態の違いに基づき両者を判別し、それぞれのコロニー数を計測した。比較対照として、43℃でも生育できる *L. rhamnosus* と同温度では生育できない *L. casei*/*L. paracasei* の特性の違いを活用し、MRS-V 寒天培地を用いて両者の菌数測定を行う方法 (42) を採用した。同一の混合希釈液を用いて M-RTLTV 寒天培地と MRS-V 寒天培地にそれぞれ接種し培養した結果、*L. rhamnosus* DSM 20021^Tと LcS、*L. casei* DSM 20011^Tおよび *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM 5622^Tのいずれの組合せにおいても両培地による菌数測定結果は同等であった (Table 2-4)。

M-RTLTV 寒天培地による糞便中の LcS 菌数測定能の評価

M-RTLTV 寒天培地による糞便中の LcS 菌数測定能を評価するため、LcS 発酵乳 (試験飲料 A または B) の飲用試験を実施した。飲用前後における、M-RTLTV 寒天培地上にコロニーを形成した菌の総数、CMR コロニーを形成した菌数および LcS 特異的抗体を用いた ELISA にて LcS と判定された菌数を Table 2-5 に示す。試験飲料の飲用前に糞便中から CMR が検出されたのは 19 名中 4 名であり、うち 1 名 (被験者 No. 2) は ELISA で LcS と判定された。試験飲料を 1 週間継続飲用した後の糞便を M-RTLTV 寒天培地にて培養した

結果、19 名中 18 名から CMR コロニーが検出された。試験飲料 A 群に含まれる被験者 No. 13 では、バックグラウンドで生育した菌の数が非常に多く培地プレート全体に広がっており、CMR を識別できなかった。検出された CMR コロニーの大部分は ELISA により LcS と判定され、個々の被験者における CMR と LcS の菌数は同等であった。試験飲料 A 群における CMR コロニー形成菌数は $6.7 \pm 0.6 \log_{10} \text{CFU/g}$ 糞便、LcS 菌数は $6.6 \pm 0.7 \log_{10} \text{CFU/g}$ 糞便であり、試験飲料 B 群では CMR コロニー形成菌数、LcS 菌数共に $6.5 \pm 0.6 \log_{10} \text{CFU/g}$ 糞便であった（平均値 \pm 標準偏差）。

Table 2-3. 各種乳酸菌株の M-RTL V 寒天培地上でのコロニー形態

菌株	コロニー形態		
	色	形状	大きさ (mm)
LcS	赤色	円形	1.0
<i>L. casei</i> DSM 20011 ^T	赤色	円形	1.0
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 5622 ^T	赤色	いびつ	1.0–1.5
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 8741	赤色	円形	1.0
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 20006	赤色	いびつ	2.0–3.0
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 20008	赤色	いびつ	1.5–2.0
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 20020	赤色	円形	1.0
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 20244	赤色	いびつ	2.0–3.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 20021 ^T	白色、赤色の斑点	円形	2.0–3.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 8743	白色、赤色の斑点	円形	2.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 8744	白色、赤色の斑点	円形	2.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 8745	白色、赤色の斑点	いびつ	1.5–2.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 8746	ピンク色	円形	2.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 20022	白色、赤色の斑点	円形	1.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 20245	白色、赤色の斑点	円形	2.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 20247	白色、赤色の斑点	いびつ	2.0–3.0
<i>L. rhamnosus</i> DSM 20711	白色、赤色の斑点	円形	1.0
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 ^T	—	—	—
<i>L. brevis</i> ATCC 14869 ^T	—	—	—
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSM 20081 ^T	—	—	—
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931 ^T	白色	円形	<0.5
<i>L. fructivorans</i> JCM 1117 ^T	—	—	—
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917 ^T	赤色	円形	1.0
<i>L. reuteri</i> JCM 1112 ^T	白色、赤色の斑点	円形	<0.5
<i>L. ruminis</i> JCM 1152 ^T	—	—	—
<i>L. sakei</i> JCM 1157 ^T	ピンク色	円形	<0.5

—：生育を認めない

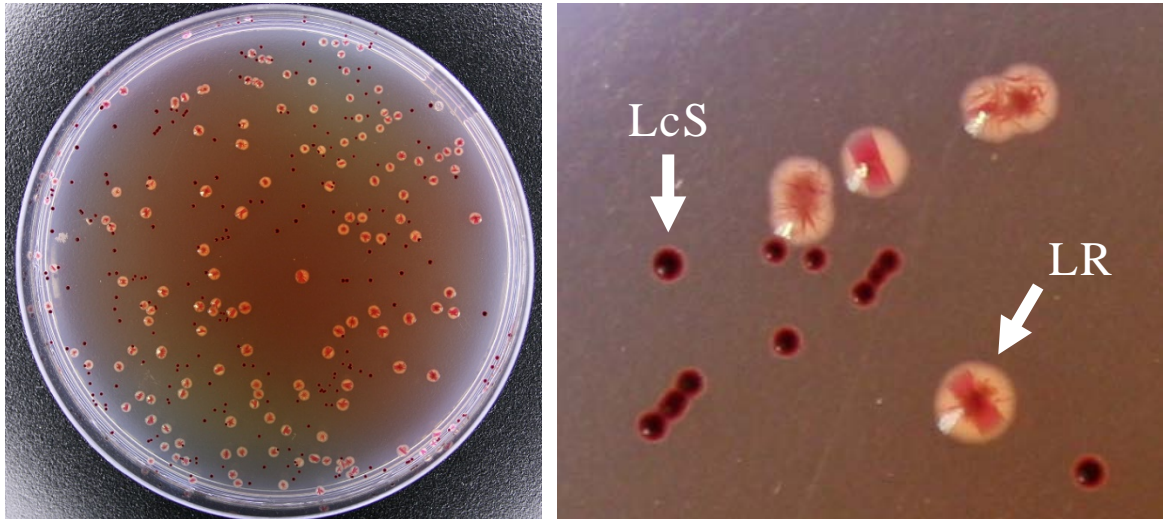


Fig. 2-2. M-RTL V 寒天培地上での LcS および *L. rhamnosus* DSM 20021^T (LR) のコロニー形態 (左: プレート全体、右: 一部を拡大)。 LcS は小さめの赤色の円形コロニーを呈し、LR は外側が白色で赤い斑点のある大きめの円形コロニーを呈する。

Table 2-4. M-RTLV 寒天培地および MRS-V 寒天培地による *L. rhamnosus* DSM 20021^T (LR) と LcS、*L. casei* DSM 20011^T (LC) または *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM 5622^T (LP) 混合希釈液中の菌数比較

	M-RTLV 寒天培地上の			MRS-V 寒天培地上の		
	コロニー数			コロニー数		
	総数 (LR+LcS)	LR	LcS	37℃培養 (LR+LcS)	43℃培養 (LR)	LcS ^a
(LcS+LR)-1	247.5	170.0	77.5	251.0	175.5	75.5
(LcS+LR)-2	375.0	156.0	219.0	367.5	149.0	218.5
(LcS+LR)-3	419.5	65.0	354.5	404.0	86.5	317.5
	総数 (LR+LC)	LR	LC	37℃培養 (LR+LC)	43℃培養 (LR)	LC ^a
(LC+LR)-1	225.5	203.0	22.5	239.5	205.0	34.5
(LC+LR)-2	183.0	140.0	43.0	205.5	155.5	50.0
(LC+LR)-3	112.0	53.0	59.0	119.0	64.0	55.0
	総数 (LR+LP)	LR	LP	37℃培養 (LR+LP)	43℃培養 (LR)	LP ^a
(LP+LR)-1	254.0	196.5	57.5	226.0	191.5	34.5
(LP+LR)-2	253.5	154.0	99.5	247.0	143.5	103.5
(LP+LR)-3	269.5	75.0	194.5	261.5	77.5	184.0

コロニー数は N = 2 の平均値を示した。^a37℃培養のコロニー数から 43℃培養のコロニー数を差し引いた推定値として算出した。

Table 2-5. 試験飲料の飲用前後における、M-RTL V 寒天培地上で生育した糞便中の生菌総数、*L. casei*/*L. paracasei*様の円形、中程度の赤色コロニー(CMR)を呈した菌数および LcS と同定された菌数の比較

試験飲料 A

被験者	飲用前の生菌数 (log ₁₀ CFU/g 糞便)			飲用後の生菌数 (log ₁₀ CFU/g 糞便)		
	総数	CMR	LcS	総数	CMR	LcS
1	6.7	< 2.3	< 2.3	7.2	5.9	5.9
2	6.0	5.9	5.9	7.6	7.6	7.6
4	5.6	< 2.3	< 2.3	8.0	6.8	6.6
7	7.0	< 2.3	< 2.3	7.0	6.5	6.5
10	< 2.3	< 2.3	< 2.3	5.9	5.9	5.8
12	7.2	< 2.3	< 2.3	7.5	7.5	7.5
13	8.3	< 2.3	< 2.3	8.9	< 2.3	< 2.3
16	4.4	4.2	< 2.3	6.6	6.6	6.5
17	2.8	< 2.3	< 2.3	6.4	6.4	6.4
平均値	6.0	—	—	7.2	6.7	6.6
標準偏差	1.7	—	—	0.9	0.6	0.7

試験飲料 B

被験者	飲用前の生菌数 (log ₁₀ CFU/g 糞便)			飲用後の生菌数 (log ₁₀ CFU/g 糞便)		
	総数	CMR	LcS	総数	CMR	LcS
3	5.0	< 2.3	< 2.3	7.5	7.5	7.5
5	6.0	< 2.3	< 2.3	6.0	6.0	6.0
6	4.7	< 2.3	< 2.3	5.4	5.4	5.4
8	3.8	< 2.3	< 2.3	8.0	6.0	5.9
9	6.3	4.4	< 2.3	6.8	6.3	6.3
11	6.9	< 2.3	< 2.3	7.1	7.1	7.1
14	5.4	5.4	< 2.3	7.2	7.0	7.0
15	5.6	< 2.3	< 2.3	6.6	6.6	6.6
19	4.2	< 2.3	< 2.3	6.3	6.3	6.3
20	7.5	< 2.3	< 2.3	8.3	6.8	6.8
平均値	5.5	—	—	6.9	6.5	6.5
標準偏差	1.2	—	—	0.9	0.6	0.6

< 2.3 : 検出下限値未満。平均値および標準偏差は検出下限値以上の値を用いて算出した。飲用前の CMR、LcS は検出率が低いため算出しなかった。

2.4 考察

L-ラムノースを炭素源とし、pH 変化による呈色反応を示す TTC を用いた新規な乳酸菌鑑別用選択培地として開発された M-RTLTV 寒天培地の性能評価を行った。本培地を用いて培養した場合、LcS を含む *L. casei*/*L. paracasei* は赤色のコロニーを形成するのに対し、*L. rhamnosus* は赤色の斑点のある白色コロニーまたはピンク色のコロニーを形成した (Table 2-3)。また、*L. casei*/*L. paracasei* と *L. rhamnosus* を共に含む菌液を M-RTLTV 寒天培地で培養した場合、同一のプレート上でも両者は異なる形態のコロニーを形成し、目視で見分けて個別に菌数測定可能であることが確認された (Fig. 2-2、Table 2-4)。

Tharmaraj および Shah は、生育可能温度の違いにより *L. casei* と *L. rhamnosus* を含む菌液から両者の菌数を測定する方法を確立した (42)。この方法では、*L. rhamnosus* を測定するための 43℃培養用、*L. casei* と *L. rhamnosus* の両者を含む菌の総数を測定するための 37℃培養用という一対の MRS-V 寒天培地を要する。37℃と 43℃でそれぞれ温度設定したインキュベーターを使用するため、測定作業は煩雑となる。また、43℃では *L. rhamnosus* のみ実測できるが、37℃では両者が生育するため *L. casei* を実測できず、37℃で得られた総数から 43℃で得られた *L. rhamnosus* の数を差し引いて推定値として算出する。一方、M-RTLTV 寒天培地は単一のプレート、温度条件にて培養することにより、混合希釈液に含まれる *L. casei*/*L. paracasei* と *L. rhamnosus* のコロニー数を個別に実測できる。M-RTLTV 寒天培地による測定方法は、MRS-V 寒天培地を用いる Tharmaraj らの方法に比べて簡便であり、かつ実測による精度の高さを有すると考えられた。

M-RTLTV 寒天培地を LcS の消化管生残性評価に適用可能か検証するため、ベルギーに居住する健常成人を対象とした LcS 発酵乳の飲用試験を実施した。飲用前に採取した糞便を M-RTLTV 寒天培地で培養したところ、19 名のうち 4 名の糞便から LcS を含む *L. casei*/*L. paracasei* 様の CMR コロニーが検出され、被験者 No. 2 の CMR コロニーに含まれる菌は ELISA により LcS と同定された。この被験者以外の糞便から検出された CMR コロニーに含まれる菌は、内在性の *L. casei*/*L. paracasei* であると推察された。LcS 発酵乳 (試験飲料 A または試験飲料 B) の飲用後、19 名のうち 18 名の糞便から CMR コロニーが検出され、その大半が LcS と同定された (Table 2-5)。このことから、M-RTLTV 寒天培地は LcS 発酵乳摂取後に糞便から排出される LcS をコロニー形態に基づいて判別でき、LcS 摂取による消化管生残性の評価に適用可能と考えられた。ただし、被験者 No. 13 では、バックグラウンドの菌が培地プレート全体を覆っており、CMR コロニーを検出できなかった。糞便の

培養に適用する際の M-RTLV 寒天培地の精度を高めるためには、バンコマイシン以外の抗生物質を追加するなど、更なる改良が必要と考えられた。

本試験では、試験飲料 A の飲用後に平均で $6.6 \pm 0.7 \log_{10}$ CFU/g 糞便、試験飲料 B の飲用後に $6.5 \pm 0.6 \log_{10}$ CFU/g 糞便の LcS 生菌がそれぞれ検出された (Table 2-5)。摂取した LcS 発酵乳中の生菌数 (1 本当たり 6.5×10^9 CFU) から換算すると、糞便 1 g 当たりの平均回収率は試験飲料 A が 0.061%、試験飲料 B が 0.049% と算出された。日本国内で LLV 寒天培地と ELISA を組み合わせて評価した過去の飲用試験結果 (12-14) から同様に算出した場合、平均回収率は 0.050~0.084% であった。今回の試験により得られた LcS 摂取後の糞便中の LcS 生菌数は、LLV 寒天培地による過去の試験実績と同等であったと考えられた。培養法は、培地の性質の違いにより選択圧の掛かり方も異なるが、M-RTLV 寒天培地の培地特性は LcS の消化管生残性評価には影響を及ぼさないと判断された。

本研究では、プロバイオティクス乳酸菌として LcS を用いて M-RTLV 寒天培地の性能評価および消化管生残性評価を行った。LcS 以外にも *L. casei*/*L. paracasei* および *L. rhamnosus* に属する乳酸菌が市販の発酵乳製品等に用いられており、この培地を同様の評価に適用可能と考えられる。また、中には一つの製品中に複数の乳酸菌種が含まれていることもあり、製品中の個々の乳酸菌数を同一の寒天培地上で測定するといった品質管理にも応用することが期待される。さらに、菌株のスクリーニングにも応用可能と考えられ、炭素源を L-ラムノースから別の糖に変えるなど、ターゲットに応じて利用の幅も広がる技術と考えられる。

以上、M-RTLV 寒天培地は *L. casei*/*L. paracasei* と *L. rhamnosus* を簡便に見分けられる選択培地であり、LcS の消化管生残性評価に適用可能であることが確認された。本研究にて確認された評価手法の特徴は、LcS のみならず、プロバイオティクス乳酸菌の研究に幅広く応用可能であり、本研究分野の更なる発展に貢献するものと期待される。

第 3 章 便秘症状に関する精度の高い評価手法の導入および LcS の機能性評価

3.1 硬めの便の排出頻度に基づく評価手法の導入および便が硬めの健常成人を対象とした LcS 発酵乳の飲用効果検証

3.1.1 緒言

便秘とは満足な排便が得られない状態であり、個々の主観に応じて症状の捉え方が異なる。古くから、排便頻度の低下が便秘を表す簡便な指標として扱われてきたが、毎日排便があるにも関わらず便秘の自覚がある方もいることから、排便頻度だけで説明することはできない(43)。便秘は主観に委ねられることから、自己申告型の評価手法が数多く開発されてきた(44)。一方、便秘症状の表現は国や地域、言語によって異なり得る。異なる国や地域でも同じ水準で便秘の状態を評価するためには、地域性や言語に依存しない評価手法の構築が必要である。

便秘に関連する状態変化として、硬めの便 (hard or lumpy stools)の排出は、便秘の発症に応じて高頻度に認められる。過去の調査において、硬めの便の排出は排便時のいきみや残便感、排便困難と関連すること(45,46)、ローマ II 基準や便秘の自己申告との比較により最も優れた陰性尤度比(便秘のある人による否定的な回答/便秘の無い人による否定的な回答)を示すことが報告されている(47)。








便の硬さを評価するためには、便の形や状態を視覚的に評価する方法が有効である。O'Donnell らが開発したブリストル便性状スケール (Bristol Stool Form Scale : BSFS) は、便性状を 7 つのタイプに分けてイラストで示した指標である(48、Fig. 3-1-1)。BSFS のスコアは、腸通過時間と相関関係を示すことが複数の試験により確認されている(48-51)。また、機能性消化管障害の診断に関する世界的基準であるローマ基準にて、過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome : IBS) や機能性便秘の診断において便の状態を評価する指標として BSFS が推奨されている(52,53)。ローマ基準で便秘型 IBS および機能性便秘を診断するための項目の一つとして「排便の 25%以上で硬めの便が出る」が含まれており、BSFS スコア 1 (硬くてコロコロした木の实のような便 : separate hard lumps, like nuts) またはスコア 2 (いくつかの塊があるソーセージ状の便 : sausage-shaped but lumpy) が硬めの便に該当する。ローマ基準の機能性便秘の診断基準では、上記を含む 6 項目のうち、2 項目以上に当てはまることを条件としている (Table 3-1-1)。これらのことから、硬めの便の排出を排便の 25%未満に抑えることは臨床上有意義であり、BSFS スコア

に基づいて「排便の 25%以上で硬めの便が出る」状態を判定することは、地域や言語を問わず導入できる有効な評価方法となり得ると考えた。

過去の試験において、LcS 発酵乳の継続飲用による便性状の改善が報告されている。例えば、Matsumoto らは、LcS 生菌を 4×10^{10} CFU 以上含む LcS 発酵乳の継続飲用により、飲用前に比べて便秘傾向者の便性状スコアが改善したことを報告している (13)。同試験では便性状を 5 つのタイプに分けて日誌を用いた自己申告記録に基づきスコア化しているが、日本国内でのみ使用されており、その評価手法のバリデーションに関する報告は無い。Koebnick らは、LcS 生菌を 6.5×10^9 CFU 以上含む LcS 発酵乳の飲用により、LcS を含まないプラセボ飲用者に比べて硬めの便の発生が有意に低減したことを報告している (54)。この試験では BSFS を改変し、便性状を元の 7 タイプから 5 タイプに集約しているため、BSFS のバリデーションによる有効性が適切に反映されているとはいえない。また、1 週間毎の振り返りにより評価していたため、被験者の記憶によるバイアスを否定できない。便秘に対する LcS の有効性を評価するため、バリデートされた 7 タイプの BSFS を用い、排便毎に記録することが望ましいと考えた。

そこで、世界的な便秘の診断基準であるローマ基準をもとに、BSFS を用いて「排便の 25%以上で硬めの便が出る」ことを指標とした解析手法を導入し、LcS 発酵乳の継続飲用による効果を検証した。併せて、便秘関連症状や便中の代謝産物に対する影響も調べた。

THE BRISTOL STOOL FORM SCALE

Type 1		Separate hard lumps, like nuts (hard to pass)
Type 2		Sausage-shaped but lumpy
Type 3		Like a sausage but with cracks on its surface
Type 4		Like a sausage or snake, smooth and soft
Type 5		Soft blobs with clear-cut edges (passed easily)
Type 6		Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool
Type 7		Watery, no solid pieces ENTIRELY LIQUID

Reproduced by kind permission of Dr KW Heaton,
Reader in Medicine at the University of Bristol.
©2000 Produced by Norgine Pharmaceuticals Limited.

Fig. 3-1-1. ブリストル便性状スケール (BSFS) の見本

Reproduced with kind permission of Dr KW Heaton, formerly Reader in Medicine at the University of Bristol. ©2000 produced by Norgine Pharmaceuticals Limited.

Table 3-1-1. 機能性便秘の診断に関するローマ III 基準

1. 以下の 6 項目のうち, 2 項目以上を満たす
 - a. 排便の 25%以上で排便時にいきみがある
Straining during at least 25% of defecations
 - b. 排便の 25%以上で硬めの便が出る
Lumpy or hard stools in at least 25% of defecations
 - c. 排便の 25%以上で残便感を感じる
Sensation of incomplete evacuation for at least 25% of defecations
 - d. 排便の 25%以上で直腸肛門の閉塞感や排便困難感がある
Sensation of anorectal obstruction/blockage for at least 25% of defecations
 - e. 排便の 25%以上で用手的に排便促進の対応をしている
(摘便、骨盤底圧迫など)
Manual maneuvers to facilitate at least 25% of defecations (e.g., digital evacuation, support of the pelvic floor)
 - f. 排便回数が週に 3 回未満である
Fewer than 3 defecations per week
 2. 下剤を使わないときに軟便になることは稀である
Loose stools are rarely present without the use of laxatives
 3. 過敏性腸症候群 (IBS) の診断基準を満たさない
There are insufficient criteria for IBS
- ※6 か月以上前から症状があり、直近 3 か月間は上記の基準を満たしていること
Criteria fulfilled for the last 3 months with symptom onset at least 6 months prior to diagnosis
-

3.1.2 材料および方法

被験者

硬めの便が頻繁に出るとの自覚があり、少なくとも 2 日に 1 回排便のある 18 歳～65 歳の健常成人男女を被験者とした。被験者の募集は Drug Research Unit Ghent が行った。試験の実施に先立ち、全ての被験者から同意書への署名を受けると共に、年齢等の背景情報および服薬歴を取得した。飲用試験への参加者を選抜するため、被験者に対して BSFS を用いた日誌に便の状態を 1 週間記録させた。平均 BSFS スコア<3.0 となった被験者を飲用試験の参加者とした。

被験者の除外基準は次のとおりとした：①法的承諾年齢に満たない者 ②精神的または法的に能力が十分でないとみなされる者 ③消化管の手術歴を有する者、または慢性的な消化管障害を有する者 ④重度の消化管障害を有する者 ⑤妊婦あるいは妊娠の予定がある者 ⑥パラセタモール、経口避妊薬およびホルモン補充療法を除く服薬を避けることが困難である者 ⑦薬物中毒またはアルコール中毒の履歴を有する者。試験期間中、被験者には試験飲料を除くプロバイオティクス製品、プレバイオティクス製品またはヨーグルト製品の摂取を控えるよう指導した。

飲用試験プロトコール

飲用試験スケジュールを Fig. 3-1-2 に示す。本試験は、単一施設によるランダム化オープンラベル非飲用対照試験として実施した。層別ブロックランダム化により、40 名の被験者を LcS 発酵乳群と非飲用群に男女均等に割り付けた。1 週間の観察期間と 3 週間の飲用期間にて試験を実施し、非飲用群は試験飲料を飲用しない観察期間 4 週間とした。

被験者は、試験期間を通じて BSFS および便秘関連症状を日誌に記録すると共に糞便検体を週 3 回採取した。糞便の一部（0.5～2 g 程度）を 2 本の採便チューブ（SARSTEDT、ニュームブレヒト、ドイツ）に採取し、分析に供するまで凍結状態を維持した。被験者は日誌と糞便検体を試験実施施設（Drug Research Unit Ghent）まで毎週持参した。

試験の実施に先立ち、Ghent University Hospital の倫理審査委員会による承認を受けた。本試験はヘルシンキ宣言の主旨、GCP その他の法令を遵守して実施した。

試験飲料

試験飲料は、1 本 65 mL 当たり 6.5×10^9 CFU の LcS を含む発酵乳（Table 3-1-2）であり、Yakult Europe B.V.より提供された。LcS 発酵乳群には、試験

飲料を冷蔵庫で保管するよう指示し、飲用期間中は 1 日 1 本飲用させた。

評価項目

本試験の主要評価項目は、週当たり排便の 25%以上で硬めの便（BSFS スコア 1 または 2 に該当）が出る被験者の比率とした。副次的評価項目は BSFS スコア、便秘関連症状スコア、便中水分含量、便中の短鎖脂肪酸濃度およびパラクレゾール濃度とした。

BSFS スコア、便秘関連症状スコアおよび排便回数

便性状を 7 段階に分けた BSFS のイラストと共にスコアを示した日誌にて、排便毎に該当するスコアを記録した。排便時の痛み（Painful effort during bowel movement）、排便後の残便感（Feeling incomplete on bowel movement）、排便時のいきみ（Straining during bowel movement）、トイレの滞在時間（Minutes in lavatory per attempt）、排便未遂（Unsuccessful attempts for bowel movement）、腹部の不快感（Abdominal discomfort）をそれぞれ 4 段階に分けた質問票に回答した（Table 3-1-3）。排便時の痛み、排便後の残便感、排便時のいきみおよびトイレの滞在時間は排便毎に記録し、排便未遂および腹部の不快感は日毎に記録した。排便回数と残便感の無い排便回数（排便後の残便感に関する質問票にてスコア 1 と回答した場合）は、日誌記録から算出した。

便中水分含量、短鎖脂肪酸濃度およびパラクレゾール濃度の測定

便中水分含量は、糞便検体の凍結乾燥前後における重量差から算出した。

既報（13, 14, 55）に従い、便中の短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）およびパラクレゾールの濃度は高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography : HPLC）により測定した。糞便検体の処理は次のとおり行った。

短鎖脂肪酸：糞便検体に対して 10 倍容（w/v）となるよう 0.1 M リン酸緩衝液（pH 5.5）を加えて糞便懸濁液を調製した。この懸濁液 0.8 mL に対して 10%（v/v）過塩素酸溶液 0.1 mL と 100 mM クロトン酸（内部標準）溶液 0.1 mL を混合し、タンパク質除去のため 4℃で一晩静置した。その後、遠心分離した上清を 0.45 μm フィルターにて濾過し、HPLC 解析に供した。

パラクレゾール：糞便懸濁液 5 mL、濃塩酸 2 mL および 250 μg/mL パラクロロフェノール（内部標準）溶液 0.2 mL をガラス試験管に入れて混合し、60 分間煮沸して加水分解を行った。室温で放冷した後、ジエチルエーテル 4 mL を混合液に加え、1 分間攪拌して有機溶媒抽出を行った。遠心分離後、溶媒層 3 mL を別の試験管に移し、0.05 N 水酸化ナトリウム/メタノール溶液 3 mL と混合して中和した。遠心濃縮機を用いて混合液を蒸発乾燥し、ペレッ

トを精製水 1 mL に溶解した後 0.45 μ m フィルターにて濾過し、HPLC 解析に供した。

統計解析

全ての統計解析は SAS バージョン 9.1.3 (SAS Institute Inc.、ケーリー、ノースカロライナ州、米国) にて実施した。

サンプルサイズの推定は次のとおり行った。未発表データから、平均 BSFS スコア < 3.0 となる健常成人のベースラインにおける排便の 25% 以上で硬めの便が出る人の比率は 85.7% と見積もられた。既報 (54) を参照し、LcS 発酵乳の継続飲用によりその比率は 26.4% まで低減すると推定された。非飲用群は変化無しとした。カイ二乗検定にて両側検定による有意水準を 5% とした場合、80% の検出力を得るために必要な被験者数は 13 名と見積もられた。途中脱落の可能性を考慮し、1 群の被験者数を 20 名と設定した。

排便の 25% 以上で硬めの便が出る被験者の比率は、一般化推定方程式 (generalized estimating equation model : GEE model) で両側検定にて 0.05 を有意水準として解析した。BSFS スコア、便秘関連症状スコア、便中水分含量および便中代謝産物濃度の変化は、反復測定の変分分析 (repeated analysis of covariance model : repeated ANCOVA model) で両側検定にて 0.05 を有意水準として解析した。排便回数および残便感の無い排便回数も repeated ANCOVA model にて解析した。

年齢、身長、体重、body mass index (BMI) および性別はスチューデントの t 検定およびカイ二乗検定により比較した。有効性評価は最大の解析対象集団 (full-analysis set : FAS) を対象として実施した。全割付被験者のうち、いずれかの有効性データが得られた者を FAS とした。被験者背景情報の影響を考慮して GEE model および repeated ANCOVA model に組み入れ、 $P < 0.2$ となるパラメータを解析モデルに含めた。



Fig. 3-1-2. 飲用試験スケジュール

Table 3-1-2. 試験飲料 1 本当りの組成

容量 (mL)	65
LcS 生菌数 (CFU)	$\geq 6.5 \times 10^9$
エネルギー (kcal/kJ)	27.3/114
脂肪分 (g)	< 0.1
炭水化物 (g)	6.6
タンパク質 (g)	0.9

Table 3-1-3. 便秘関連症状スコア

	スコア			
	1	2	3	4
排便時の痛み Painful effort during bowel movement	None	Little	Some	A lot
排便後の残便感 Feeling incomplete on bowel movement	None	Little	Some	A lot
排便時のいきみ Straining during bowel movement	None	Little	Some	A lot
トイレの滞在時間 Minutes in lavatory per attempt	< 5min	5-10 min	10-20 min	20 min or more
排便未遂 Unsuccessful attempts for bowel movement	Never	1 time	2times	3 times or more
腹部の不快感 Abdominal discomfort	Never	Rarely	Sometimes	Always

3.1.3 結果

被験者情報

39名の被験者が試験を完遂した。LcS 発酵乳群の被験者1名は、制限された薬剤を服用したため脱落とした。被験者の背景情報に両群間で差はみられなかった (Table 3-1-4)。

硬めの便が出る被験者の比率および便性状の変化

排便の25%以上で硬めの便が出る被験者の比率変化を LcS 発酵乳群と非飲用群で比較した (Fig. 3-1-3)。LcS 発酵乳群では、3週間の継続飲用により該当する被験者の比率が73.7%から36.8%に低下したのに対し、非飲用群では同一期間における被験者比率は75.0%から85.0%に変化しており、群間で有意差を認めた ($P=0.002$)。また、BSFS スコアおよび便中水分含量の変化を Table 3-1-5 に示した。3週間の LcS 発酵乳飲用により BSFS スコアの平均値は2.76から3.25に改善 (便が軟化) したのに対し、非飲用群では2.34から2.50の変化であり、両群間に有意差を認めた ($P<0.001$)。便性状の変化により便中の水分含量にも変化が生じると想定されたが、検査結果では両群間に差は認められなかった ($P=0.426$)。

便秘関連症状および便中代謝産物の変化

便秘関連症状および便中代謝産物の変化を Table 3-1-6、3-1-7 に示した。トイレの滞在時間のスコアは非飲用群に比べて LcS 発酵乳群で低かった ($P<0.001$)。その他の項目には特記すべき変化を認めなかった。また、腸内細菌による炭水化物の代謝産物であり、腸の蠕動運動促進や腸管バリア機能増強などの生理効果が報告されている短鎖脂肪酸 (56, 57) については、LcS 発酵乳飲用による変化は見られなかった。腸内細菌によるタンパク質の代謝産物であり、腸内腐敗産物の一つとして知られるパラクレゾール (58) は、非飲用群で期間中に増加していたのに対し、LcS 発酵乳群ではあまり変化が見られなかった ($P=0.023$)。

排便回数の変化

排便回数および残便感の無い排便回数への影響を調べた (Table 3-1-8)。排便回数は両群共に1週目で平均約6回/週であり、ほぼ毎日排便のある正常な範囲内であった。一方、残便感の無い排便回数は飲用前で平均3回強/週であり、概ね2回に1回近くの割合で残便感を感じていたと推測された。試験飲料の継続飲用により、排便回数は平均6.2回/週から7.9回/週に、残便感の無い排便回数は3.2回/週から5.3回/週にそれぞれ増加したのに対し、非飲用

群では排便回数が 5.9 回/週から 6.0 回/週、残便感の無い排便回数が 3.5 回/週から 3.9 回/週の変化にとどまった（排便回数： $P < 0.001$ 、残便感の無い排便回数： $P = 0.039$ ）。

Table 3-1-4. 被験者背景情報

	LcS 発酵乳群 (n = 19)	非飲用群 (n = 20)	<i>P</i>
年齢 (歳)	35.4 ± 14.2	32.1 ± 13.6	0.460 ^a
身長 (cm)	175.8 ± 12.3	171.7 ± 9.5	0.253 ^a
体重 (kg)	73.1 ± 12.1	70.9 ± 13.2	0.595 ^a
BMI (kg/m ²)	23.7 ± 3.5	23.9 ± 3.1	0.825 ^a
性別 (n)			
女性/男性	11/8	12/8	0.894 ^b

年齢、身長、体重および BMI の結果は平均値 ± 標準偏差で示した。^a スチューデントの *t* 検定、^b カイ二乗検定。

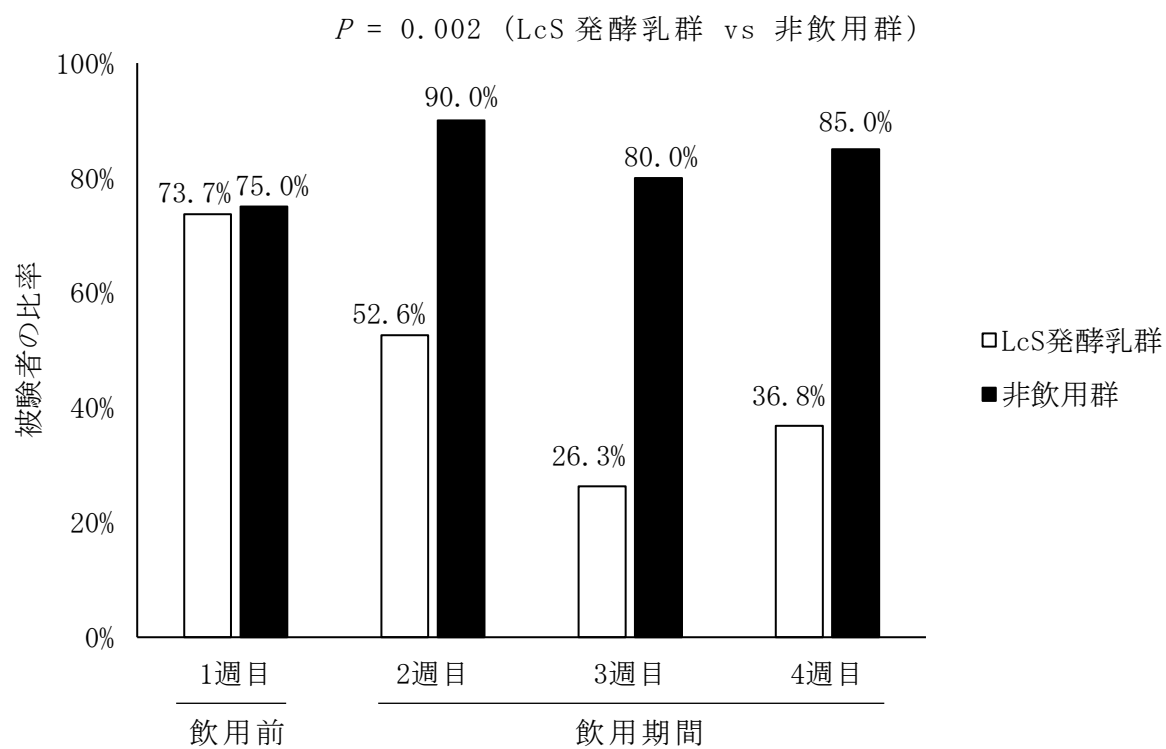


Fig. 3-1-3. 排便の25%以上で硬めの便が出る被験者の比率の変化。統計解析には GEE model を用いた。

Table 3-1-5. BSFS スコアおよび便中水分含量の変化

	飲用前	飲用期間（飲用前からの変化）			P
	1 週 目	2 週 目	3 週 目	4 週 目	
BSFS スコア					
LcS 発酵乳群	2.76 ± 0.39	2.99 ± 0.71 (0.23 ± 0.68)	3.39 ± 0.53 (0.63 ± 0.39)	3.25 ± 0.59 (0.49 ± 0.55)	< 0.001
非飲用群	2.34 ± 0.52	2.31 ± 0.54 (−0.03 ± 0.40)	2.28 ± 0.69 (−0.06 ± 0.57)	2.50 ± 0.71 (0.16 ± 0.66)	
便中水分含量（%）					
LcS 発酵乳群	72.5 ± 5.9	73.8 ± 4.9 (1.4 ± 6.0)	72.7 ± 4.9 (0.2 ± 5.7)	71.7 ± 6.0 (−0.8 ± 5.8)	0.426
非飲用群	72.1 ± 4.2	70.7 ± 5.4 (−1.4 ± 3.8)	69.9 ± 6.7 (−2.1 ± 4.7)	71.0 ± 5.4 (−1.1 ± 4.2)	

結果は平均値 ± 標準偏差で示した。統計解析には repeated ANCOVA model を用いた。

Table 3-1-6. 便秘関連症状スコアの変化

	飲用前	飲用期間（飲用前からの変化）			P
	1 週 目	2 週 目	3 週 目	4 週 目	
排便時の痛み					
LcS 発酵乳群	1.65 ± 0.68	1.48 ± 0.57 (−0.17 ± 0.67)	1.51 ± 0.56 (−0.14 ± 0.65)	1.40 ± 0.42 (−0.25 ± 0.55)	0.078
非飲用群	1.64 ± 0.50	1.54 ± 0.59 (−0.10 ± 0.40)	1.46 ± 0.42 (−0.18 ± 0.57)	1.40 ± 0.41 (−0.24 ± 0.66)	
排便後の残便感					
LcS 発酵乳群	1.87 ± 0.63	1.84 ± 0.77 (−0.03 ± 0.66)	1.77 ± 0.89 (−0.10 ± 0.63)	1.47 ± 0.55 (−0.40 ± 0.56)	0.273
非飲用群	1.63 ± 0.64	1.50 ± 0.64 (−0.13 ± 0.36)	1.46 ± 0.49 (−0.17 ± 0.51)	1.57 ± 0.60 (−0.07 ± 0.50)	
排便時のいきみ					
LcS 発酵乳群	2.23 ± 0.67	1.90 ± 0.73 (−0.33 ± 0.75)	1.93 ± 0.70 (−0.30 ± 0.68)	1.68 ± 0.58 (−0.55 ± 0.57)	0.054
非飲用群	2.14 ± 0.73	1.81 ± 0.68 (−0.33 ± 0.55)	1.73 ± 0.53 (−0.41 ± 0.46)	1.64 ± 0.55 (−0.49 ± 0.54)	
トイレの滞在時間					
LcS 発酵乳群	1.57 ± 0.59	1.51 ± 0.48 (−0.06 ± 0.40)	1.46 ± 0.39 (−0.11 ± 0.51)	1.42 ± 0.48 (−0.15 ± 0.40)	< 0.001
非飲用群	1.31 ± 0.37	1.31 ± 0.41 (0.01 ± 0.20)	1.29 ± 0.35 (−0.02 ± 0.22)	1.25 ± 0.39 (−0.06 ± 0.27)	
排便未遂					
LcS 発酵乳群	1.23 ± 0.28	1.17 ± 0.19 (−0.06 ± 0.22)	1.17 ± 0.31 (−0.06 ± 0.41)	1.14 ± 0.24 (−0.08 ± 0.33)	0.511
非飲用群	1.37 ± 0.64	1.30 ± 0.50 (−0.07 ± 0.28)	1.32 ± 0.64 (−0.05 ± 0.21)	1.20 ± 0.45 (−0.17 ± 0.34)	
腹部の不快感					
LcS 発酵乳群	1.47 ± 0.58	1.38 ± 0.57 (−0.08 ± 0.22)	1.29 ± 0.50 (−0.18 ± 0.41)	1.24 ± 0.37 (−0.23 ± 0.33)	0.366
非飲用群	1.27 ± 0.44	1.29 ± 0.46 (0.01 ± 0.28)	1.31 ± 0.50 (0.04 ± 0.21)	1.28 ± 0.56 (0.01 ± 0.34)	

結果は平均値 ± 標準偏差で示した。統計解析には repeated ANCOVA model を用いた。

Table 3-1-7. 便中代謝産物濃度の変化

	飲用前	飲用期間（飲用前からの変化）			P
	1 週 目	2 週 目	3 週 目	4 週 目	
酢酸（μmol/g 糞便）					
LcS 発酵乳群	28.6 ± 9.4	30.8 ± 16.3 (2.2 ± 13.7)	33.1 ± 16.7 (4.5 ± 14.6)	33.9 ± 15.6 (5.3 ± 12.0)	0.751
非飲用群	33.9 ± 11.7	32.5 ± 13.2 (-1.4 ± 10.6)	32.3 ± 11.9 (-1.5 ± 9.3)	33.7 ± 11.1 (-0.2 ± 10.1)	
プロピオン酸（μmol/g 糞便）					
LcS 発酵乳群	11.4 ± 5.0	12.7 ± 7.7 (1.3 ± 5.1)	12.4 ± 8.0 (0.9 ± 5.5)	12.5 ± 4.6 (1.1 ± 3.1)	0.488
非飲用群	11.8 ± 4.0	11.4 ± 4.1 (-0.4 ± 4.8)	10.8 ± 4.6 (-1.0 ± 4.8)	12.2 ± 2.9 (0.4 ± 4.5)	
酪酸（μmol/g 糞便）					
LcS 発酵乳群	9.6 ± 5.3	9.0 ± 5.6 (-0.5 ± 4.4)	10.2 ± 6.7 (0.6 ± 6.4)	10.3 ± 4.7 (0.7 ± 1.1)	0.458
非飲用群	10.8 ± 5.6	10.7 ± 5.0 (-0.2 ± 4.1)	10.2 ± 5.2 (-0.7 ± 4.8)	11.9 ± 7.0 (1.1 ± 6.1)	
パラクレゾール（μg/g 糞便）					
LcS 発酵乳群	49.3 ± 31.4	51.1 ± 28.9 (1.7 ± 36.4)	55.0 ± 26.4 (5.7 ± 27.5)	51.8 ± 30.0 (3.7 ± 27.9)	0.023
非飲用群	52.0 ± 30.4	64.6 ± 21.5 (12.6 ± 36.9)	61.3 ± 29.3 (9.2 ± 40.3)	69.2 ± 41.3 (17.2 ± 21.2)	

結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。統計解析には repeated ANCOVA model を用いた。

Table 3-1-8. 排便回数および残便感の無い排便回数の変化

	飲用前	飲用期間（飲用前からの変化）			
	1 週 目	2 週 目	3 週 目	4 週 目	<i>P</i>
排便回数（回/週）					
LcS 発酵乳群	6.2 ± 2.0	7.0 ± 2.1 (0.7 ± 1.4)	7.6 ± 2.7 (1.4 ± 2.1)	7.9 ± 3.1 (1.7 ± 1.8)	< 0.001
非飲用群	5.9 ± 1.5	6.0 ± 2.0 (0.1 ± 1.0)	5.9 ± 1.7 (0.0 ± 1.2)	6.0 ± 2.0 (0.1 ± 1.7)	
残便感の無い排便回数（回/週）					
LcS 発酵乳群	3.2 ± 2.2	3.7 ± 3.3 (0.6 ± 2.2)	4.5 ± 3.3 (1.4 ± 2.5)	5.3 ± 3.0 (2.1 ± 2.6)	0.039
非飲用群	3.5 ± 2.4	4.1 ± 2.6 (0.6 ± 1.6)	4.2 ± 2.3 (0.7 ± 2.2)	3.9 ± 2.8 (0.4 ± 2.5)	

結果は平均値 ± 標準偏差で示した。統計解析には repeated ANCOVA model を用いた。

3.1.4 考察

本試験において、機能性便秘に関するローマ基準における診断項目の一つである「排便の 25%以上で硬めの便が出る」を評価項目として採用し、これに該当する被験者の比率変化より LcS 発酵乳の機能性評価を行った。硬めの便の排出を 25%未満に抑えることは、便秘の診断におけるリスク要因の一つを低減することにつながり、臨床的な意義は大きいと考えられる。また、ローマ基準でも推奨される BSFS を使用し、そのスコアを排便毎に記録させることにより評価の精度を高めた。LcS 発酵乳を 3 週間継続飲用することにより、排便の 25%以上で硬めの便が出る被験者の比率は半減した (Fig. 3-1-3)。一方、非飲用群ではそのような変化は認めなかった。本試験の実施以前にも便秘に関連するプロバイオティクスの効果に関する報告は幾つか確認されているが (54, 59-61)、筆者の知る限り、このようなローマ基準を基にした評価項目を採用した例は無い。今回導入した評価項目は、便秘の臨床診断の視点からプロバイオティクスの機能性を評価する手法として有用と考えられる。

本試験では、ローマ基準 (52) に従い、BSFS スコア 1 または 2 に該当する便を硬めの便と定義付けた。過去の研究報告から、BSFS スコアは腸通過時間と相関することが示されている (48-51)。Degen と Phillips は、消化管症状や消化管疾患の罹患歴、腹部手術歴の無い健常人の腸通過時間と BSFS スコアの関係性について調査した。スコア 1-3 に該当する硬めの便が出る場合、スコア 4 に該当する中間的な便、スコア 5-7 に該当する軟らかめの便が出る場合に比べて腸通過時間が遅延していた (50)。硬めの便が出る頻度が高い場合、重度の消化管障害でなくとも腸管の蠕動運動は低下していることが推察される。BSFS による評価に基づいた硬めの便の排出頻度が低減することは、腸管蠕動運動の活発化を反映していると考えられる。BSFS はイラストで視覚的に便の状態を評価することが可能であり、言語や地域を問わず適用できる非常に有用なツールである。本試験にて、LcS 発酵乳を 3 週間継続飲用することにより、BSFS スコアの平均値も正常化の方向へシフトすることを確認した (Table 3-1-5)。

BSFS スコアの変化が確認された一方で、便の状態を客観的に表す便中水分含量については LcS 発酵乳の飲用による明確な変化を認めなかった (Table 3-1-5)。その原因の一つとして、水分含量測定のため凍結乾燥に供した糞便量が少なかったことが挙げられる。本試験では、糞便の一部 (0.5~2 g 程度) を採取して提出してもらい、便中水分含量と代謝産物の解析に使用した。BSFS による評価は排泄された便全体を眺めて行うのに対し、水分含量は全体のうち一部分を選択して評価していたことになる。糞便の一部のみでは、

消化されなかった食物の残渣（種や食物繊維など）が測定値に影響を及ぼす可能性がある。糞便の全量ではボリュームが大きく、装置の容量や能力、凍結乾燥の原理を考慮すると、そのままの状態では水分含量の解析に供することは難しいが、全量を採取して均質化し、その中から複数の部分を選択して解析することで精度の高い評価を行うことができる可能性がある。また、BSFSは排便毎にスコアを記録したのに対し、水分含量は週3回分のみ評価していたことから、全ての排出便の結果を反映していないことも一因として挙げられる。その他、オープンラベル試験として実施したことから、LcS発酵乳を飲んでいることを被験者が自覚しており、自己評価であるBSFSの結果にバイアスが掛かっていた可能性も否定できない。精度をさらに高めるため、試験デザインの改善も検討課題である。

酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸もLcS発酵乳の飲用による変化は認められなかった（Table 3-1-7）。短鎖脂肪酸は、腸内細菌による炭水化物の主要な代謝産物であり、乳酸菌等の産生する乳酸を利用して短鎖脂肪酸に変換する腸内細菌も存在することが知られている（56, 57）。また、短鎖脂肪酸が腸管の蠕動運動を刺激し、便秘の緩和につながることを示唆されている（31, 56）。今回、LcS発酵乳の継続飲用により腸通過時間との相関が確認されているBSFSスコアの改善が示されてものの、便中の短鎖脂肪酸量との関連性は示されなかった。糞便は侵襲無く採取できる臨床検体として有用であるが、腸内細菌により産生された短鎖脂肪酸の大部分は腸管にて吸収されるため、糞便にて測定できる短鎖脂肪酸量は全体の5%未満に過ぎないとの指摘もある（56）。プロバイオティクスや腸内細菌の代謝産物による腸管内での局所的な作用と臨床的評価との関連については、更なる検証が必要である。

便秘関連症状のスコア変化をみると、トイレの滞在時間の変化にLcS発酵乳群と非飲用群で差を認めた（Table 3-1-6）。しかしながら、1週目（LcS発酵乳群の飲用前）の値をみるとLcS発酵乳群ではスコアの平均値が1.57であったのに対し、非飲用群では1.31であり、最も良い状態であることを示すスコア1に近かった。そのため、非飲用群は変化の余地が少なかった可能性もある。トイレの滞在時間に及ぼす影響を正確に評価するためには、時計を用いて実際に掛かった時間を測ることが必要と考えられた。その他の便秘関連症状については群間での明確な違いはみられなかった。今回採用した便秘関連症状については群間での明確な違いはみられなかった。今回採用した便秘関連症状は一般的に評価対象となる項目であったものの、事前にスコアの反応性などバリデーションされたものではなかった。便秘は主観に応じて症状の捉え方が異なることから、個別の項目で評価するだけでなく、複数の項目による結果を統合的に評価可能なバリデーションされた手法を導入する必要がある。

本試験の被験者である便が硬めの健常成人において、飲用前における残便感の無い排便回数は、総排便回数のほぼ半数であった。LcS 発酵乳の継続飲用により排便回数の増加を認めただけでなく、残便感の無い排便回数も増加していた。4 週目（飲用 3 週目）では、排便回数の平均増加数（1.7 回/週）よりも残便感の無い排便回数の平均増加数（2.1 回/週）の方が大きく、満足な排便が得られやすくなることが示唆された（Table 3-1-8）。慢性便秘症の治療薬に関する臨床試験では、残便感の無い排便回数が主要評価項目として採用されることが多い（62–65）。排便頻度の低下と残便感は共に便秘の状態を評価する上で重要であり、薬剤だけでなくプロバイオティクスのような食品素材の有効性評価にも有用と考えられた。

以上、BSFS のスコアを用いた「排便の 25% 以上で硬めの便が出る」というローマ基準に基づく評価手法を構築した。本手法により、LcS 発酵乳の継続飲用による便秘のリスク要因の低減効果が示された。その他、排便回数や残便感の無い排便回数も増えており、LcS 発酵乳は食生活として取り込むことのできる便秘の対応策として有用と考えられた。一方、便秘関連症状を精度高く統合的に評価するため、バリデートされた新たな評価手法を導入すること、バイアスの掛かりにくい試験デザインとすることが課題として挙げられた。

3.2 便秘症状や便秘に伴う生活の質の評価手法導入および産褥期の女性を対象とした LcS 発酵乳の飲用効果検証

3.2.1 緒言

3.1 にて、BSFS スコアおよびローマ基準に基づき硬めの便の排出頻度を指標とした評価手法の有用性を示した。一方、硬めの便の排出以外の便秘関連症状の評価についても臨床的な妥当性が検証されている手法を導入し、LcS の機能性評価に適用していくことが望ましい。McCrea らは、便秘に関する自己申告型の質問票に関するシステマティックレビューを行い、妥当性、信頼性、精度等の観点から有用性を検証した。結果、推奨される質問票として Chinese Constipation Questionnaire (CCQ) と Patient Assessment of Constipation Symptom (PAC-SYM) Questionnaire を選定した (44)。CCQ は 6 項目から構成される質問票であり、感度 (sensitivity: 罹患している人の中で検査結果が陽性である人の割合)、特異度 (specificity: 罹患していない人の中で検査結果が陰性である人の割合) が共に 91% と高い (66)。しかしながら、CCQ は中国人のみを対象として開発されており、中国語以外の言語による検証は実施されていない。

一方 PAC-SYM は、患者の便秘症状の評価を目的として米国で開発された質問票であり、12 項目から構成される (67)。複数の集団において有用性の検証が重ねられており、再現性が高く、経時的な便秘症状の変化を捉えることができる。また、便秘は慢性化すると生活の質 (quality of life: QoL) の低下を招く。Patient Assessment of Constipation Quality of Life (PAC-QOL) は 28 項目から構成され、PAC-SYM と共に便秘関連の QoL 変化を調べることに適した、バリデートされた質問票である (68)。PAC-SYM、PAC-QOL は便秘薬のグローバル治験における有効性評価にも適用されており、飲用試験による LcS の機能性評価に活用できるのではないかと考えた。

便秘になりやすい集団として、周産期の女性が挙げられる。出産後は身体的・精神的な変化が大きく、特に産後間もない産褥期はホルモンバランスの変化や育児ストレス、睡眠不足等による身体への影響が著しい時期である。便秘は、妊娠中および出産後の女性において一般的に認められる消化管症状である (69–76)。出産後に痔が認められるケースも多く、排便時のいきみが痔のリスク要因となること、痔の発症が便秘の原因にもなり得ることが示唆されている (69, 72, 77–81)。また、便秘や痔は出産後でも特に産褥期において割合が高いことが報告されている (70)。育児中の母親にとって更なるストレスとなり得ることから、これらの症状を緩和することは母親の QoL 向上につながり、育児にも好影響を与えと考えられる。

便秘の対策として食事や生活習慣の改善が第一に挙げられ、出産前に栄養学の知識や健康的な生活習慣に関する教育を行うことは、出産後の便秘改善にも有効であることが報告されている(82)。このアプローチは、食生活の要因と便秘の発症との関連性を示す知見を支持するものである(83)。適度な運動や食物繊維、水分の摂取も一般的に有用とされているが、科学的根拠に乏しいとの報告もある(84,85)。生活習慣等の改善でも効果がみられない場合は緩下剤による便秘の治療が行われ、浸透圧調節剤、軟便化剤、膨張化剤がはじめに利用される(85)。これらの緩下剤は妊娠中でも使用可能であるが、副作用として膨満感、痙攣、電解質異常を引き起こすこともある(86)。次の段階で使用されるのは刺激性の緩下剤である。センナは出産後における排便状況の改善に有効であることが示されているものの、腹部痙攣が副作用として懸念される(87)。

育児を営む出産後の女性にとっては安全かつストレスの掛からない便秘対策が理想的であり、有効な手段の確立が望まれている。安全性が高く発酵乳飲料として手軽に摂取可能であり、排便状況等の改善効果が報告されている LcS は、出産後の女性における便秘ケアに有用ではないかと考えた。

そこで、産褥期の女性を対象とした LcS 発酵乳飲用によるプラセボ対照二重盲検試験を実施し、PAC-SYM および PAC-QOL を採用して便秘関連症状および QoL に対する効果を検証した。併せて、出産後の女性に多く、便秘との関連性も示唆されている痔に対する効果も調べた。

3.2.2 材料および方法

被験者

被験者の募集は SGS Life Science Services (アントワープ、ベルギー)が行った。出産予定日から 8 週以内の健康な妊婦が被験者のスクリーニングに参加し、条件を満たす候補者は更に出産関連の条件を満たすか否かの評価を受けた。選択条件は次のとおり：①18 歳以上 40 歳以下である者 ②妊娠中における通常の便性状が BSFS スコア 1 または 2 に該当する者 ③自然分娩で出産した者。除外基準は次のとおり：①承諾年齢未満である者、精神的能力または法的能力が十分でない者 ②妊娠中における通常の便性状が BSFS スコア 3 以上である者 ③帝王切開で出産した者、妊娠 37 週未満の早産または 2,500 g 未満の低出生体重で出産した者 ④出産児が先天性奇形である者、または集中治療を要する者 ⑤出産後に細菌またはウイルス感染を患った者 ⑥妊娠前に慢性的な消化管疾患の履歴がある者、重篤な消化管障害を抱える者、または虫垂切除術を除く消化管の手術歴がある者 ⑦ミルクアレルギーまたは乳糖不耐症を有する者 ⑧薬物中毒またはアルコール中毒の履歴があ

る者 ⑨本試験を完遂できない、または試験手順や要件を満たすことができない可能性があるとして試験責任者が判断した者。

観察期間および飲用期間中、被験者は試験飲料を除くプロバイオティクス製品またはヨーグルト製品の摂取、緩下剤、抗生物質その他の試験結果に影響を及ぼす可能性があるとして試験責任者が判断した薬剤の服用を制限された。ただし、制限された食品または薬剤を摂取した場合でも試験参加の継続を認めた。

飲用試験プロトコール

本試験はランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験として実施した。飲用試験スケジュールを Fig. 3-2-1 に示す。試験期間は、妊娠中最長 8 週間の選抜期間、4 日間の観察期間（出産当日～出産後 3 日目）および 6 週間の飲用期間（出産後 4 日目以降）で構成された。選抜時に全被験者より署名済み同意書を取得し、条件を満たす者は飲用期間中に LcS を含む発酵乳を飲用する群（LcS 発酵乳群）またはプラセボを飲用する群（プラセボ群）へランダムに割り付けられた。被験者は、観察期間および飲用期間中に排便回数、便性状および痔の出血の有無を含む排便習慣に関する日誌記録した。また、飲用 14 日目、28 日目および 42 日目に PAC-SYM および PAC-QOL の各質問票に回答させた。なお PAC-SYM/PAC-QOL のライセンスは Mapi Research Trust（リヨン、フランス）が保有しており、事前に使用許諾契約を締結した。なお、PAC-SYM および PAC-QOL のベースラインデータ取得は行わなかった。日誌は 1 週毎に回収し、PAC-SYM および PAC-QOL の質問票は 2 週毎に回収した。被験者には毎週 10 本の試験飲料（予備 3 本を含む）を配布し、飲用済みおよび未飲用のボトルを回収して飲用コンプライアンスを確認した。

試験の実施に先立ち、倫理審査委員会（Commissie Voor Medische Ethiek Ziekenhuisnetwerk Antwerpen）により承認を受け、試験を実施した。本試験はヘルシンキ宣言、GCP その他の適用法の倫理規範に従った。

試験飲料

LcS 発酵乳は、1 本当たり 6.5×10^9 CFU の LcS を含む飲料であり、欧州域内で市販されている製品（Yakult）と同一である。原材料として脱脂粉乳、ぶどう糖果糖液糖、デキストリン、香料を含む。プラセボは LcS を含まない未発酵の酸性乳であり、LcS 発酵乳と同じ原材料を含み、栄養素、外観、風味は LcS 発酵乳と同等に調整した（Table 3-2-1）。両試験飲料は Yakult Europe B.V. で製造した。

ランダム化および盲検化

被験者は LcS 発酵乳群とプラセボ群に 1:1 でランダムに割り付けた。ランダム化リストは SGS Life Science Services のデータ管理部門により作成され、被験者には二桁の被験者番号が割り当てられた。

試験飲料のボトルに予めラベルを施し、無地の箱に入れて被験者へ提供した。被験者、試験運用担当者、試験実施者は盲検状態が維持された。Yakult Europe B.V.の試験飲料提供担当者と試験実施施設の飲料管理担当者のみ、割付情報を把握した。被験者割付情報は封緘し、アクセス制限・安全管理された場所に試験終了まで保管した。

評価項目

評価項目は、2 週間毎における排便の 25%以上で硬めの便が出る被験者の比率、BSFS スコア、排便回数、残便感の無い排便回数、PAC-SYM/PAC-QOL スコアおよび痔の出血（排便後に認められた肛門部の出血）とした。PAC-SYM は、症状の強さに応じて 0～4 の 5 段階でスコア化されるリッカート尺度の質問票であり、総合スコアおよび腹部症状、直腸症状、排便症状の 3 つのサブスケールスコアで評価される。PAC-QOL は、便秘に関連する状態の程度や頻度に応じて 0～4 の 5 段階でスコア化されるリッカート尺度の質問票であり、総合スコアおよび身体的不快感、心理的不快感、心配・不安感、満足感の 4 つのサブスケールスコアで評価される。PAC-SYM/PAC-QOL のスコア算出は、Mapi Research Trust より提供された説明書に従った。BSFS、SBM、SCBM および痔の発生は日誌より、PAC-SYM および PAC-QOL は質問票よりそれぞれデータを取得した。

統計解析

サンプルサイズは、過去の試験（54）における硬めの便の排出率より推定した。同試験では、LcS 発酵乳飲用後における硬めの便の排出率は 29%、プラセボ飲用後では 82%であった。有意水準を 0.05 とした両側検定によるカイ二乗検定に基づき、80%の検出力を得るために 1 群 17 名が必要と算出された。被験者脱落の可能性を考慮し、1 群 20 名と設定した。

有効性評価は、ランダム化された被験者のうち試験飲料を少なくとも 1 回飲用し、かついずれかの評価項目のデータを少なくとも 1 つ取得した、最大の解析対象集団（FAS）を対象に実施した。被験者が、制限されている食品や薬剤を摂取した場合、その日に取得したデータは有効性評価の解析から除外した。試験期間中、制限されている食品や薬剤を 3 回以上続けて摂取した場合、重大なプロトコル違反とみなした。欠損値は解析に含めないこととした。

排便の25%以上で硬めの便が出る被験者の比率は GEE model で解析した。BSFS スコア、PAC-SYM スコア（総合および3つのサブスケール）、PAC-QOL スコア（総合および4つのサブスケール）、痔の出血は repeated ANCOVA model または GEE model を用いて解析した。統計解析は両側検定で有意水準は 0.05 とした。被験者背景情報の影響を考慮するため、各パラメータの関連性が $P < 0.2$ となった場合は統計解析モデルに組み入れた。全ての統計解析には、SAS ソフトウェアバージョン 9.1.3 を用いた。

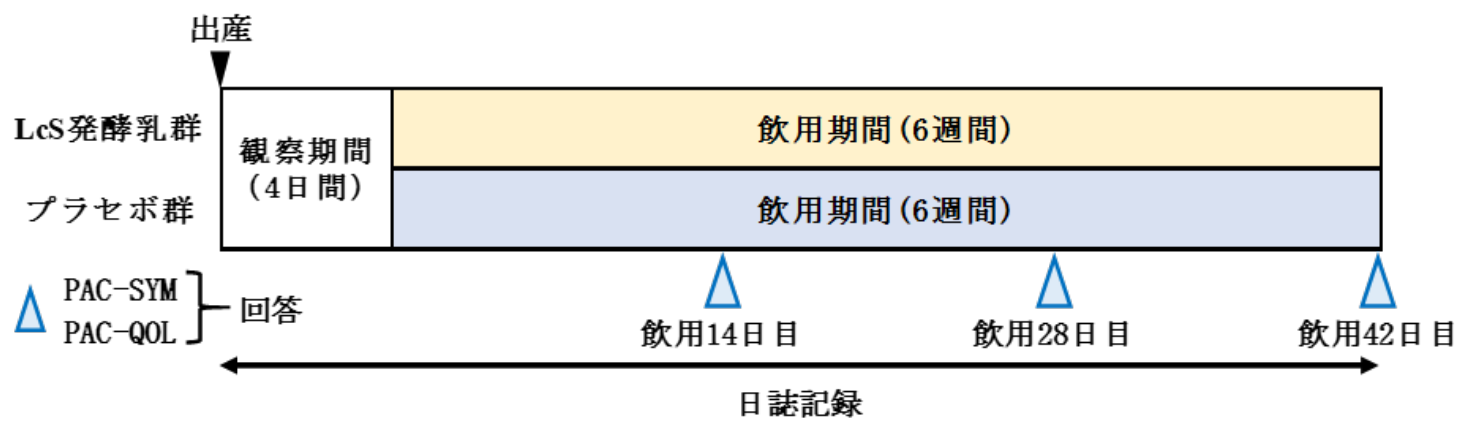


Fig. 3-2-1. 飲用試験スケジュール

Table 3-2-1. 試験飲料 1 本当りの組成

	LcS 発酵乳	プラセボ
容量 (mL)	65	65
LcS 生菌数 (CFU)	$\geq 6.5 \times 10^9$	—
エネルギー (kcal/kJ)	42.9/182	42.9/182
脂肪分 (g)	< 0.1	< 0.1
炭水化物 (g)	9.6	9.6
タンパク質 (g)	0.9	0.9

3.2.3 結果

被験者情報

61名の候補者から条件に合致する40名を選抜して被験者とし、LcS発酵乳群およびプラセボ群に20名ずつランダムに振り分けた。全被験者が試験を完遂し、解析対象とした。Table 3-2-2に被験者の背景情報を示した。いずれの項目も群間にて顕著な差はみられなかった。

硬めの便が出る被験者の比率および便性状の変化

3.1の試験同様、排便の25%以上で硬めの便が出る被験者の比率を調べた (Fig. 3-2-2)。LcS発酵乳群では該当する被験者比率が飲用1-2週目では62.5%であり、飲用5-6週目には33.3%まで低下した。一方、プラセボ群は飲用1-2週目が66.7%であり、飲用5-6週目には40.0%となった。試験期間を通じてLcS発酵乳群の方がプラセボ群よりも該当する被験者の比率は低かったものの、群間に有意差は認めなかった ($P=0.589$)。BSFSスコア、排便回数および残便感の無い排便回数の変化をTable 3-2-3に示した。LcS発酵乳群における各項目の平均値は飲用1-2週目に比べて飲用5-6週目で高くなっていたが、プラセボ群も同様の変化を示し、いずれも群間に有意差を認めなかった (BSFSスコア： $P=0.622$ 、排便回数： $P=0.188$ 、残便感の無い排便回数： $P=0.404$)。

便秘関連症状およびQoLの変化

PAC-SYMスコアの変化をTable 3-2-4に示した。LcS発酵乳群において、総合スコアおよび腹部症状、直腸症状、排便症状の各サブスケールスコアの平均値は飲用1-2週目に比べて飲用5-6週目で低下しており、改善を示す方向に変化していた。総合スコア、腹部症状スコアおよび直腸症状スコアは、プラセボ群と比較して低かった (それぞれ $P=0.013$ 、 $P=0.043$ 、 $P=0.031$)。また、PAC-QOLスコアの変化をTable 3-2-5に示した。PAC-SYMと同様、LcS発酵乳群にて総合スコアおよび各サブスケール (身体的不快感、心理的不快感、心配・不安感、満足感) スコアの平均値は飲用1-2週目に比べて飲用5-6週目で低下しており、改善方向に変化した。満足感サブスケールについては、プラセボ群に比べてLcS発酵乳群のスコアが低く推移した ($P=0.037$)。

痔の出血に関する変化

試験期間中の各日において痔の出血がみられた被験者数の推移をFig. 3-2-3に示した。LcS発酵乳群では、飲用3週目までは2~4名の被験者に痔の

出血を認めたのに対し、飲用 4 週目では痔の出血がみられた被験者は 0～1 名に減り、飲用 5-6 週目ではほぼ認められなくなった。一方、プラセボ群では試験期間を通じて 4 名前後の被験者が痔の出血を認めており、その数に明確な変化はみられなかった。少なくとも 2 週間に 1 回、痔を経験する推定確率は LcS 発酵乳群が 18.8%、プラセボ群が 56.1%であり、LcS 発酵乳群の方が低かった ($P = 0.009$)。

Table 3-2-2. 被験者背景情報

	LcS 発酵乳群 (n = 20)	プラセボ群 (n = 20)
年齢 (歳) ^a	29.6 ± 3.3	31.4 ± 4.6
身長 (cm) ^a	169.2 ± 6.0	169.5 ± 4.6
体重 (kg) ^a	65.6 ± 9.8	69.3 ± 9.7
BMI (kg/m ²) ^a	22.9 ± 2.7	24.2 ± 3.3
人種 (n)		
白色人種	20 (100%)	18 (90%)
アジア人種	0 (0%)	1 (5%)
その他	0 (0%)	1 (5%)
妊娠中の BSFS スコア (n)		
スコア = 1	5 (25%)	4 (20%)
スコア = 2	15 (75%)	16 (80%)
出産歴 (n)		
初産	8 (40%)	6 (30%)
経産	12 (60%)	14 (70%)
出産時の会陰切開 (n)		
有り	10 (50%)	6 (30%)
無し	10 (50%)	14 (70%)
出生児の体重 (g) ^a	3,438 ± 370	3,556 ± 299
出生児の性別 (n)		
女性	7 (35%)	10 (50%)
男性	13 (65%)	10 (50%)
観察期間の便性状および排便回数		
BSFS スコア/排便 ^b	2.5 ± 0.31	3.3 ± 0.34
排便回数/4 日間 ^b	2.6 ± 0.44	2.1 ± 0.33
残便感の無い排便回数/4 日間 ^b	2.1 ± 0.41	1.9 ± 0.23

結果は次のとおり示した：^a 平均値 ± 標準偏差、^b 平均値 ± 標準誤差。

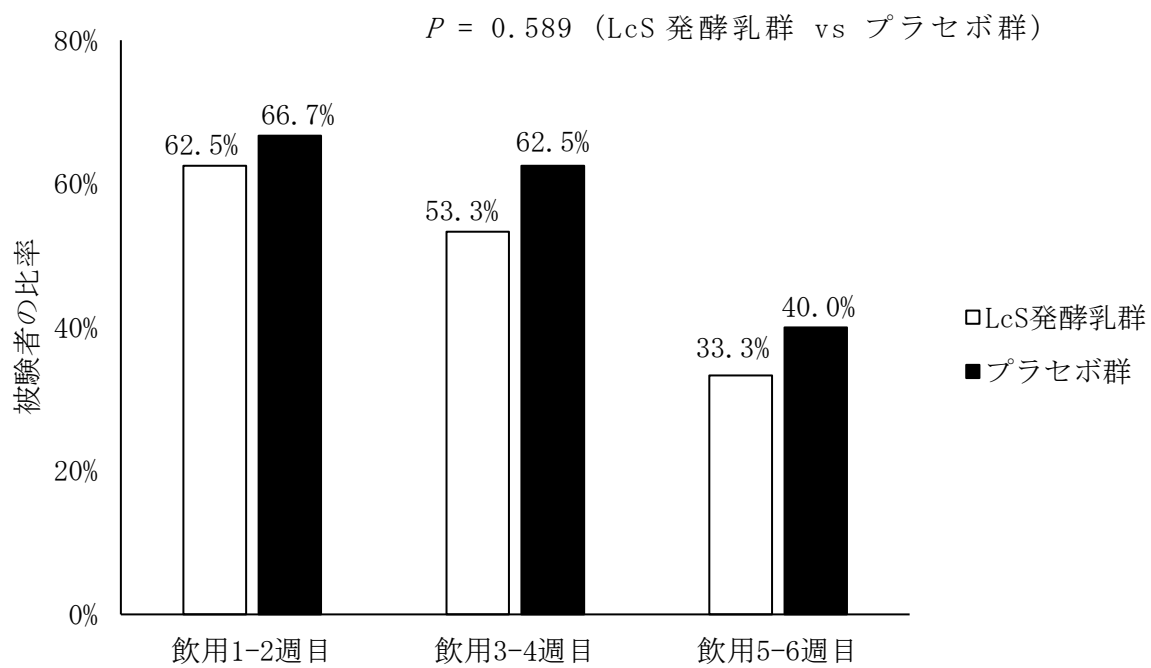


Fig. 3-2-2. 排便の25%以上で硬めの便が出る被験者の比率の変化。統計解析には GEE model を用いた。

Table 3-2-3. BSFS スコア、排便回数および残便感の無い排便回数の変化

	飲用 1-2 週 目	飲用 3-4 週 目	飲用 5-6 週 目	<i>P</i>
BSFS スコア				
LcS 発酵乳群	3.0 ± 0.23	2.8 ± 0.25	3.3 ± 0.26	0.622
プラセボ群	3.1 ± 0.32	3.0 ± 0.31	3.4 ± 0.29	
排便回数 (回/2 週間)				
LcS 発酵乳群	13.4 ± 0.83	13.7 ± 1.38	15.1 ± 1.37	0.188
プラセボ群	10.1 ± 0.84	11.8 ± 1.58	13.1 ± 2.02	
残便感の無い排便回数 (回/2 週間)				
LcS 発酵乳群	9.5 ± 1.31	11.4 ± 1.66	11.7 ± 1.67	0.404
プラセボ群	7.3 ± 1.02	8.8 ± 1.60	11.1 ± 1.88	

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析には repeated ANCOVA model を用いた。

Table 3-2-4. PAC-SYM スコアの変化

	飲用 1-2 週 目	飲用 3-4 週 目	飲用 5-6 週 目	<i>P</i>
総合スコア				
LcS 発酵乳群	1.3 ± 0.20	1.1 ± 0.22	0.6 ± 0.17	0.013
プラセボ群	1.6 ± 0.15	1.4 ± 0.16	1.1 ± 0.14	
腹部症状スコア				
LcS 発酵乳群	0.7 ± 0.20	0.7 ± 0.19	0.3 ± 0.12	0.043
プラセボ群	1.1 ± 0.16	1.0 ± 0.15	0.6 ± 0.15	
直腸症状スコア				
LcS 発酵乳群	1.1 ± 0.24	1.0 ± 0.33	0.5 ± 0.24	0.031
プラセボ群	1.5 ± 0.26	1.4 ± 0.29	1.1 ± 0.27	
排便症状スコア				
LcS 発酵乳群	1.7 ± 0.29	1.5 ± 0.28	0.9 ± 0.23	0.095
プラセボ群	2.2 ± 0.20	1.8 ± 0.18	1.5 ± 0.19	

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析には repeated ANCOVA model を用いた。

Table 3-2-5. PAC-QOL スコアの変化

	飲用 1-2 週目	飲用 3-4 週目	飲用 5-6 週目	<i>P</i>
総合スコア				
LcS 発酵乳群	1.1 ± 0.17	0.9 ± 0.21	0.6 ± 0.15	0.119
プラセボ群	1.2 ± 0.17	1.0 ± 0.14	0.9 ± 0.15	
身体的不快感スコア				
LcS 発酵乳群	1.0 ± 0.22	0.9 ± 0.23	0.5 ± 0.20	0.238
プラセボ群	1.1 ± 0.13	1.0 ± 0.15	0.8 ± 0.14	
心理的不快感スコア				
LcS 発酵乳群	0.6 ± 0.15	0.5 ± 0.19	0.2 ± 0.08	0.349
プラセボ群	0.7 ± 0.16	0.4 ± 0.15	0.4 ± 0.14	
心配・不安感スコア				
LcS 発酵乳群	1.0 ± 0.17	0.7 ± 0.23	0.5 ± 0.17	0.179
プラセボ群	1.1 ± 0.22	0.9 ± 0.17	0.7 ± 0.19	
満足感スコア				
LcS 発酵乳群	2.3 ± 0.31	2.1 ± 0.31	1.5 ± 0.27	0.037
プラセボ群	2.5 ± 0.24	2.4 ± 0.21	2.3 ± 0.21	

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析には repeated ANCOVA model を用いた。

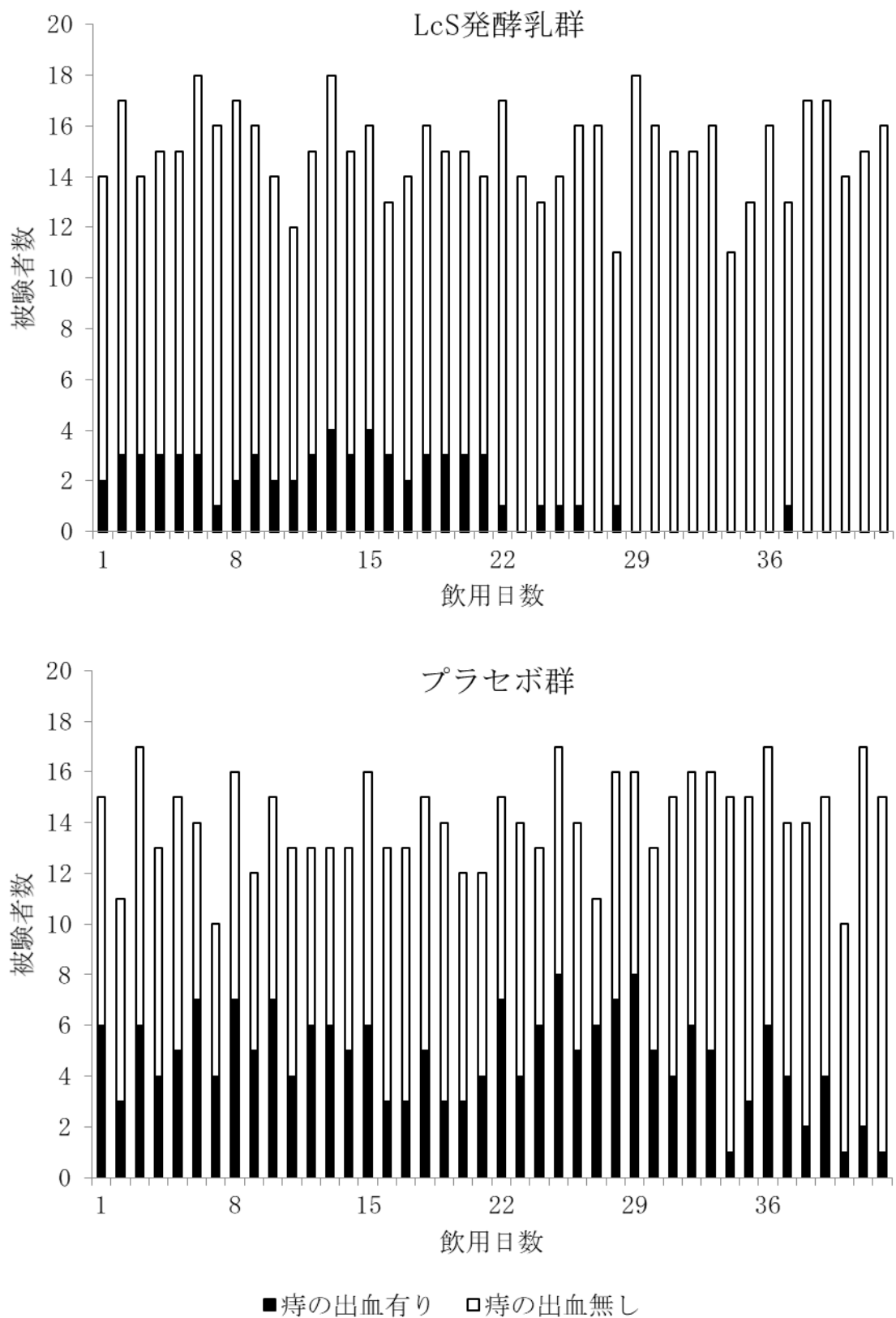


Fig. 3-2-3. 痔の出血がみられた被験者数の推移

3.2.4 考察

本試験にて、便秘関連症状および QoL に対する LcS の機能性評価を行うため、PAC-SYM および PAC-QOL を採用した。その結果、プラセボとの比較により LcS 発酵乳の継続飲用による有効性が示された (Table 3-2-4、3-2-5)。PAC-SYM 総合スコアに関して飲用 5-6 週目でプラセボ群に比べて LcS 発酵乳群の平均値が 0.5 ポイント下回っていた。本質問票を開発した Frank らの報告 (67) によると、0.5 ポイントの変化は最小限の臨床的な改善 (minimal clinical improvement) を示すものであり、産褥期の女性に対する LcS による便秘症状の改善効果はこのレベルに該当すると考えられた。また、PAC-SYM は 0~4 の 5 段階スコア (0 : absent、1 : mild、2 : moderate、3 : severe、4 : very severe) により評価される。飲用 1-2 週目における平均スコアは LcS 発酵乳群で 1.3、プラセボ群で 1.6 であり、mild から moderate の間で便秘症状を感じていた。飲用 5-6 週目でもプラセボ群では平均スコアが 1.1 と mild に近い値であったのに対し、LcS 発酵乳群では 0.6 となり absent に近づいていた。飲用 1-2 週目のスコアから、もともと便秘症状が重篤な集団ではないと判断されるが、症状から解放される方向に変化したことは産後ケアの観点から意義深い。

また、PAC-QOL では総合スコアに群間差は認められなかったものの、満足感サブスケールは LcS 発酵乳群の方がプラセボ群よりも平均スコアが低くなった。満足感サブスケールは、被験者が自身の排便状況にどの程度満足しているかを示しており、0~4 の 5 段階 (0 : extremely、1 : quite a bit、2 : moderately、3 : a little bit、4 : not at all) でスコア化される (68)。飲用 1-2 週目の平均スコアは LcS 発酵乳群が 2.3、プラセボ群が 2.5 であり、moderately から a little bit の間であった。飲用 5-6 週目ではプラセボ群は 2.3 とあまり変化がみられなかったのに対し、LcS 発酵乳群では 1.5 となり quite a bit に近づいていた。PAC-SYM で確認された便秘関連症状の改善と合わせて、LcS 発酵乳の継続飲用により満足感の高い排便が得られることが示された。

PAC-SYM および PAC-QOL は直近 2 週間の振り返りにより評価を行うタイプの質問票であり、今回は飲用 14 日目 (飲用 1-2 週目の評価)、飲用 28 日目 (飲用 3-4 週目の評価) および飲用 42 日目 (飲用 5-6 週目の評価) にそれぞれスコアを記録した。出産後の早い段階から試験飲料の飲用を開始することが産後ケアにおいて重要であると考え、実現可能性も考慮の上、出産 4 日後から飲用を開始する試験デザインとした。この場合、飲用開始前に PAC-SYM および PAC-QOL の評価を実施すると出産のタイミングを挟み、被験者の状態が著しく変化すると想定されたことから、ベースラインのデータ取得は行わなかった。このような試験において試験飲料を飲用しない場合の状態

も含めて評価するためには、非飲用群も設ける試験デザインとする必要があると考えられた。

硬めの便の排出は、周産期における便秘関連の状態変化として多く確認され、約半数の母親が経験すると報告されている（73, 88）。3.1 の試験で LcS 発酵乳の継続飲用による効果が確認された「排便の 25% 以上で硬めの便が出る」被験者の比率を本試験でも評価した。結果、LcS 発酵乳群において飲用 1-2 週目（62.5%）から飲用 5-6 週目（33.3%）にかけて該当する被験者の比率はほぼ半減したが、プラセボ群でも比率の低下が確認され、群間の差はみられなかった（Fig. 3-2-2）。また、BSFS スコアにも差を認めなかった（Table 3-2-3）。本試験では、妊娠中の BSFS スコアが 1 または 2 という便が硬めである人を被験者とした。しかし両群において飲用 1-2 週目でも BSFS スコアは 3 以上となっており、想定よりも高かった。出産後の女性に対する軟便化効果を適切に評価するためには、被験者の選抜方法を検討する必要がある。LcS 発酵乳群にて、排便回数や残便感の無い排便回数の平均値は飲用 1-2 週目に比べて飲用 5-6 週目で増加していた。一方、プラセボ群でも飲用 1-2 週目から飲用 5-6 週目にかけて増加しており、群間での差は認められなかった（Table 3-2-3）。LcS 発酵乳群では飲用 1-2 週目でも 2 週間で平均 13.4 回であり、ほぼ毎日排便のある正常な範囲内であった。

過去の調査において、出産 1 か月後の女性の約 25% で痔が認められ、3 か月後に約 15% まで低下することが報告されている（70）。LcS 発酵乳群において痔がみられた被験者の数はプラセボ群に比べて少なく、飲用 5-6 週目ではほぼみられなくなった。少なくとも 2 週間に 1 回痔を経験する推定確率もプラセボ群に比べて LcS 発酵乳群で有意に低かった。興味深いことに、PAC-SYM の直腸症状サブスケールにて痔に関連する 3 項目が設定されており（painful bowel movement、rectal burning during or after a bowel movement、rectal bleeding or tearing during or after a bowel movement）、本サブスケールスコアもプラセボ群に比べて LcS 発酵乳群で改善していた（Table 3-2-4）。筆者の知る限り、本試験以前に痔に対するプロバイオティクスの効果を調べた例は無く、プロバイオティクスの新たな可能性を示す結果と考えられる。ただし、本試験では被験者の自己申告により痔の有無を判定しており、医師の診断を受けたものではない。痔に対する効果をより適切に評価するためには、医学的な検査を実施する必要がある。

以上、バリデートされた質問票である PAC-SYM および PAC-QOL を用いて便秘関連の症状や QoL の変化を評価し、産褥期の女性に対する LcS 発酵乳の継続飲用効果が示された。また、LcS 発酵乳の飲用により痔の発生が抑えられることが示された。排便の 25% 以上で硬めの便が出る被験者の比率、

排便回数および残便感の無い排便回数も LcS 発酵乳の飲用による良好な変化がみられたものの、プラセボとの差は認めなかった。

3.1 の研究と合わせて、多様な地域に適用可能な便秘に関連する評価手法の導入・検証を行い、LcS の機能性評価に利用できることを確認した。本研究にて導入した評価手法は、他のプロバイオティクスや機能性素材の有効性評価にも適用可能と考えられる。また、得られた知見をもとに便秘に対する有効性評価のプロトコール標準化を図ることで、対象者や素材の違いによる効果の差を調べることも可能となる。今後、腸管内における局所的な作用メカニズムの解明を含め、本研究分野の更なる進展、プロバイオティクスの利用拡大が期待される。

第 4 章 国際宇宙ステーション船内環境における LcS の機能性への影響評価

4.1 緒言

一般的な生活環境とは著しく異なる特殊環境では、そこで生活する人々に特有の健康管理上の課題が存在し得る。地球から離れた国際宇宙ステーション (ISS) に滞在する宇宙飛行士は、微小重力、閉鎖隔離環境、宇宙放射線など地上には無い環境要因に晒されており、数多くのミッションへの対応を含めて複合的なストレスを受けながら生活している。これまでの宇宙医学研究から、宇宙滞在による身体への影響が多数報告されている。例えば、地上での重力 (1 G) に対して ISS は $10^{-4} \sim 10^{-6}$ G という微小重力環境であり、これに起因する筋委縮・筋力低下、骨量・骨密度の減少が急速に進むことが明らかとなっている (89)。その対応策として、宇宙飛行士にはほぼ毎日、1 日 2 時間以上の運動トレーニングが課せられている。

宇宙滞在による身体影響の中でも、免疫機能の低下は重要な健康課題の一つとして取り上げられている。これまでの研究から、自然免疫に重要な役割を担う NK 細胞をはじめとする免疫細胞の活性低下や免疫バランスの変化などが報告されている (90–95)。現在、宇宙飛行士の ISS 滞在期間は半年程度であり、ISS の運用に支障をきたすような健康状態の悪化は報告されていない。一方、アメリカ航空宇宙局 (National Aeronautics and Space Administration: NASA) をはじめとする各国の宇宙機関は、月や火星への有人宇宙探査や基地建設など年単位での長期宇宙滞在を伴う将来計画を表明している。宇宙空間への滞在期間が延びることにより、免疫機能の低下に伴う感染症の発症やがんの発症など健康リスクが高まり、重篤な影響を及ぼすことが懸念されている。そのため、各国の宇宙機関が宇宙滞在による免疫機能低下への対策構築に取り組んでいる。

長期間に渡り免疫機能を適切に維持するためには、宇宙での日常生活にも取り込むことのできる対応策が求められる。食事は人々の生活に欠かせないものであり、身体機能の維持・管理に有用な機能性食材の活用が期待される。そのような食材の一つとしてプロバイオティクスに注目が集まっている。LcS は、免疫機能の維持・活性化に効果を発揮することが確認されているプロバイオティクス株である。これまでの研究から、LcS は単球・マクロファージへの取り込みにより IL-12 の産生を誘導し、NK 細胞の活性を高めること、NK 細胞活性の低下した人が LcS を継続摂取することにより、NK 細胞活性が高まることが確認されている (15–20)。80 年以上の食経験や安全性に関する知見も蓄積されており、米国にて一般に安全な食品として認められる

GRAS (Generally Recognized As Safe) 認証も取得している。これらのことから、安全な食材として LcS を宇宙空間での食生活に取り込み、宇宙滞在による免疫機能の低下に対して効果を発揮することができるのではないかと考えた。そこで、ISS に滞在する宇宙飛行士を対象とした LcS の継続摂取試験を計画した。

地上ではコールドチェーンが確立されており、製造後に冷蔵状態で速やかに流通させることが可能であるため、LcS をはじめとするプロバイオティクス乳酸菌は乳酸菌飲料やヨーグルトのような発酵乳製品の形態で一般的に利用されている。一方、ISS 船内や ISS に物資を届ける補給船内は冷蔵保管できるスペースが限られている。また容器の破損により液漏れが生じた場合、ISS や補給船内の装置の障害を引き起こす恐れもあることから、発酵乳製品としての利用は運用上困難であると判断された。この課題に対応するため、宇宙食の開発にも利用されている凍結乾燥技術を採用し、LcS の生菌を維持したまま凍結乾燥・粉末化してカプセルに充填した宇宙実験用の試験サンプルが新たに開発された。本試験サンプルは発酵乳製品と異なり、常温でも保管可能である。

前述のとおり、ISS では宇宙特有の環境要因に晒されることになり、微生物も例外ではない。ISS での運用に適した形態として開発された試験サンプルであるが、ISS に滞在する宇宙飛行士が摂取しても LcS が生きて腸に届き、腸内環境を整えて免疫機能の維持・活性化に効果を発揮するためには、ISS 船内環境でも LcS の機能が安定的に維持されることが求められる。そこで、宇宙飛行士を対象とした摂取試験に先立ち、この試験サンプルを補給船に搭載して ISS 船内で約 1 か月間保管し、宇宙空間でも LcS の生菌数、代謝機能、免疫調節作用等、LcS の機能が安定的に維持されるか、基礎的な検証を行った。

4.2 材料および方法

試験サンプル

凍結乾燥 LcS 粉末、LcS カプセルおよび LcS カプセルを含むパッケージはヤクルト中央研究所にて作製した。LcS カプセルの press-through-package (PTP) シートへの包装はアピ株式会社（岐阜）が実施した。LcS カプセル 10 個を PTP シートに封入し、乾燥機能付き脱酸素材を貼付したアルミパウチにその PTP シート 4 枚を封入した。ISS 保管品 (FS)、地上対照品（米国保管品：GC-US、日本保管品：GC-JP）のうち 1 袋ずつに宇宙放射線検出器（バイオパドレス）および温度ロガーを同梱した。

試験サンプルの運用

日付は全て日本の標準時間で示す。2015 年 12 月 2 日に試験サンプルの製造を完了し、冷蔵状態で維持した。FS および GC-US は保冷したまま米国へ空輸し、GC-JP はヤクルト中央研究所の冷蔵庫内で保管した。FS は 2015 年 12 月 14 日に米国テキサス州ヒューストンの倉庫に移され、以降は室温で保管した。これに合わせて、GC-US は NASA ジョンソン宇宙センター（ヒューストン、米国）内の恒温槽に、GC-JP はヤクルト中央研究所内の恒温槽にそれぞれ移し、22℃設定で保管した。その後、FS は米国フロリダ州にある NASA ケネディ宇宙センターへ陸路で移送した。2016 年 4 月 9 日、FS を搭載した米国 SpaceX 社の運用するドラゴン補給船運用 8 号機（SpX-8）が軌道へ打ち上げられ、翌日に ISS へドッキングして FS が ISS 船内の日本実験棟「きぼう」へ移された。ISS 船内で約 1 か月間保管した後、FS はドラゴン補給船に戻され、2016 年 5 月 12 日に地上へ帰還した。太平洋上に着水した後、FS はドラゴン補給船の中から回収され、保冷状態でジョンソン宇宙センターまで移送された。ジョンソン宇宙センター到着後は冷蔵庫に移され、GC-US と共に保冷状態を維持したまま日本に空輸し、2016 年 5 月 27 日にヤクルト中央研究所へ到着した。バイオパドレスと温度ロガーは国立研究開発法人 宇宙航空研究開発機構へ送り、解析に供した。

宇宙放射線の解析

バイオパドレスによる宇宙放射線の解析は既報に従った（96–100）。

培養法および PMA-qPCR 法による LcS 生菌数の計測

培養法：カプセル中の凍結乾燥 LcS 粉末 0.1 g を生理食塩水 9.9 mL に懸濁して 10 倍懸濁液とし、さらに 10 倍ずつ段階希釈した。希釈液は好気条件で BCP 加寒天培地（日清製薬：日本国内での計測、HIMEDIA Laboratories、ムンバイ、インド：ジョンソン宇宙センター内での計測）を用いて 37℃で最長 72 時間まで培養した。プレート上に 30～300 個のコロニーが検出された場合、解析に供した。

PMA-qPCR 法：凍結乾燥 LcS 粉末 0.1 g を PBS 9.9 mL に懸濁して 10 倍希釈液とし、この懸濁液 200 μ L を 800 μ L の PBS に加えた。20,000 g、4℃で 5 分間遠心分離した後、ペレットを洗浄し、これを 2 回繰り返した。洗浄後のペレットに 5 mM の PMA（Biotium Inc.、フレモント、米国）2 μ L を加えて懸濁し、5 分間氷冷した後、LED Crosslinker（タカラバイオ株式会社、滋賀）による光照射に供した。この PMA 処理した検体は DNA 抽出を行うまで -80℃で保管した。DNA 抽出および定量的 PCR 法は既報（101）に従い、次の LcS 特異的プライマー（102）を用いて実施した。

[プライマー配列 (5'-3')]

pLcS-57F : CTCAAAGCCCGTGACGGTC

pLcS-597R : ACGTGGTGCTAATAATCCTAGTG

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 解析

凍結乾燥 LcS 粉末 1 さじ分を試験管内の MRS 培地にて 37℃で一晩培養した。20,400 g、4℃で 3 分間遠心分離した後、ペレットを DNA 抽出バッファーに懸濁した。ガラスビーズと塩化ベンジルを懸濁液に加え、FastPrep (MP Biomedicals LLC、サンタ・アナ、米国) を用いて激しく振盪した。ドデシル硫酸ナトリウムを加えて除タンパクした後、酢酸ナトリウムを加えて DNA 抽出し、20,400 g、4℃で 8 分間遠心分離した。上清をイソプロパノール処理し、遠心分離して DNA を沈殿させた後、TE バッファーに溶解した。この DNA 溶液を用いて、次の条件にて PCR を行った：94℃・2 分×1 サイクル、94℃・30 秒－36℃・60 秒－72℃・90 秒×5 サイクル、94℃・20 秒－36℃・30 秒－72℃・90 秒×29 サイクル、72℃・3 分×1 サイクル。この PCR に使用したプライマー (103, 104) は下記のとおり。増幅した DNA 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供し、解析を行った。

[プライマー配列 (5'-3')]

p1254 : CCGCAGCCAA

p1281 : AACGCGCAAC

p1252 : GCGGAAATAG

p1280 : GAGGACAAAG

pRPIR : GGCGTCGGTT

pRPICGR : GGCCACGGAA

全ゲノムリシーケンス解析および sequence variance 解析

凍結乾燥 LcS 粉末を 0.1% (w/v) となるよう MRS 培地に懸濁し、クレット単位 300 となるまで 37℃で培養した。10,000 g、4℃で 30 分間、20,000 g、4℃で 5 分間遠心分離を繰り返した後、ペレットを TE バッファー (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH8.0) に懸濁した。この懸濁液から、ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep (Zymo Research Corp.、アーバイン、米国) を用いてゲノム DNA を調製した。ゲノム DNA 2.1 µg を DNA Shearing system M220 (Covaris Inc.、ウォーバン、米国) に供し、約 800 bp に断片化した。遺伝子ライブラリーは、TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep LS Kit (Illumina Inc.、サンディエゴ、米国) を用いて調製した。変性処理した後、15 pM のラ

イブラリーを MiSeq (Illumina Inc.) による paired-end sequencing に供した。

シーケンスデータは CLC Genomics Workbench (CLC Bio、フィンランズゲイド、デンマーク) に移し、次の条件にてトリミングを行った: trim using quality scores limit = 0.05; trim ambiguous nucleotides = 2; discard reads below length = 150. トリミング後のデータを LcS のゲノムシーケンスと照合し、マッピングを行った。Variant calling は SAMtools (105) を用いて実施し、次の条件を満たす位置の sequence variant frequency を評価した: depth for the chromosome > sequence coverage \times 1/3、depth for the plasmid > 3 \times sequence coverage \times 1/3、SP (Phred-scaled strand bias P-value) < 13。Variant frequency が 50%を超える場合、一塩基多型が生じているとみなした。

発酵性状解析

糖発酵性試験: 凍結乾燥 LcS 粉末 1 さじ分を試験管内の MRS 培地にて 37°C で一晚培養した。培養液の一部を採取し、再度 MRS 培地にて 37°C で一晚培養した。1,660 g、4°C で 20 分間遠心分離した後、ペレットを API 50 CIIL medium (シスメックス・ビオメリユー株式会社、東京) にて懸濁した。指定の手順に従い、API 50 CH strip を用いて 49 種類の糖の発酵性を評価した。

生育曲線: カプセル 1 個分の凍結乾燥 LcS 粉末を 10 mL の MRS 培地に懸濁し、さらに MRS 培地で 20 倍希釈した後、新しい MRS 培地に 1%(v/v) で接種して 37°C で 24 時間培養した。培養中、4 時間毎にサンプリングを行って pH を測定すると共に、MRS 寒天培地にて 37°C で 48~72 時間培養し、LcS の生菌数を測定した。

免疫指標解析

LcS 特異的抗体への反応性: 凍結乾燥 LcS 粉末を 2 mg/mL となるよう PBS に懸濁し、室温で 30 分間静置した。その上清を回収し、LcS 懸濁液とした。LcS 懸濁液 400 μ L を 600 μ L の PBS と混合した後に 10,000 g、4°C で 5 分間遠心分離した。ペレットに LcS 特異的モノクローナル抗体 L8 を産生するハイブリドーマ細胞培養上清の 10 倍希釈液 100 μ L を添加し、抗体反応に供した。4°C で一晚インキュベートし、PBS で 2 回洗浄した後、FITC 標識された mouse immunoglobulin light-chain antibody (clone RMK-45、BioLegend、サンディエゴ、米国) 100 μ L を添加して室温で 20 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、細胞を PBS に再懸濁してフローサイトメーター (Gallios、Beckman Coulter Inc.、フラートン、米国) による解析に供した。

細胞壁溶解酵素に対する消化耐性: 上記の抗体反応性解析と同じ LcS 懸濁液に対し、M-1 細胞壁溶解酵素 (*N*-acetylmuramidase SG、生化学工業株式会社、東京) を 50 μ g/mL となるよう添加し、37°C で最長 120 分間インキュ

ベートした。開始直後、30 分後、60 分後および 120 分後にそれぞれ 200 μ L の反応液をサンプリングし、100°C で 5 分間加熱して酵素反応を停止した。これらに 10% ドデシル硫酸ナトリウム 50 μ L を添加し、よく混合した。分光光度計にて 600 nm における濁度を測定し、開始直後の値との相対値 (%) を算出した。

IL-12 産生誘導能: 50 U/mL のペニシリンおよび 50 μ g/mL のストレプトマイシンを含む 10% FCS/RPMI 1640 培地に上記の抗体反応性解析と同じ LcS 懸濁液を終濃度 20、60、200 μ g/mL となるよう添加した。96 穴培養プレートに 1×10^5 cells/200 μ L となるようマウスマクロファージ由来 J774.1 細胞を加え、上記の LcS 懸濁液を含む培地を添加して 37°C で 24 時間インキュベートした。既報 (106) に従い、上清を IL-12p40 測定用の ELISA に供した。

4.3 結果

試験サンプルの状態および環境要因の評価

ISS にて約 1 か月間保管した後、SpX-8 で地上帰還した FS のパッケージ外観、LcS カプセル、温度ロガーおよびバイオパドレスに損傷はみられなかった (Fig. 4-1)。FS、GC-US および GC-JP の環境温度履歴を Fig. 4-2 に示す。FS は、ヒューストンの倉庫に移されてから ISS 保管後に地上へ帰還するまで、19.0°C ~ 24.5°C の温度帯で保管されており、室温保管期間における平均温度は 21.5°C であった。ISS 船内での保管期間中は、20.0°C ~ 24.5°C の温度範囲で維持されていた。FS の室温保管期間中、GC-US および GC-JP は 21°C ~ 22°C で安定的に維持された。作業のため一時的に冷蔵庫から取り出した場合を除き、冷蔵保管期間中は 4°C ~ 10°C で維持された。

バイオパドレスによる放射線の測定結果を Table 4-1 に示す。ISS 保管中の FS に対する総吸収線量は 8.53 ± 0.67 mGy in water、総線量当量は 17.08 ± 1.39 mSv であった。1 日当たりの吸収線量率、線量当量率はそれぞれ 0.26 ± 0.02 mGy、 0.52 ± 0.04 mSv と算出された。これらの値は、GC-JP の値 (0.002 mGy/日、0.004 mSv/日) の約 130 倍であった。

LcS 生菌数

LcS カプセル中の LcS 生菌数の推移を Fig. 4-3 に示す。製造直後における LcS の生菌数は 2.12×10^{11} CFU/g 粉末であった。地上対照品の検査により、試験期間中に生菌数が徐々に低下していたことを確認した。製造から約 6 か月後、地上帰還した FS、GC-US および GC-JP の生菌数を一斉に測定した。結果、FS は 1.05×10^{11} CFU/g 粉末 (製造時生菌数の 49.5%)、GC-US 8.05×10^{10} CFU/g 粉末 (同 38.0%)、GC-JP は 9.03×10^{10} CFU/g 粉末 (同 42.6%) で

あった。また、PMA-qPCR 法による測定の結果、FS は $12.5 \pm 0.02 \log_{10} \text{ cells/g}$ 粉末、GC-US は $12.4 \pm 0.08 \log_{10} \text{ cells/g}$ 粉末、GC-JP は $12.4 \pm 0.10 \log_{10} \text{ cells/g}$ 粉末となった（平均値 \pm 標準偏差）。

遺伝子解析および発酵性状解析

RAPD 解析 (Fig. 4-4) および全ゲノムリシーケンスによる sequence variance 解析による遺伝子解析 (Fig. 4-5) を実施した。6 種類の異なるプライマーを用いた RAPD 解析のバンドパターンにサンプル間（製造時、FS、GC-US および GC-JP）での違いはみられなかった (Fig. 4-4)。また、染色体およびプラスミド pLY101 の sequence variance 解析においても、サンプル間でバリエーションのパターンは同様であり、一塩基多型も確認されなかった (Fig. 4-5)。また、試験サンプル中の LcS を再培養したときの生育曲線および pH 変化 (Fig. 4-6)、49 種類の糖に対する発酵性を調べた (Table 4-2、Fig. 4-7)。これら発酵性状もサンプル間で違いは認められなかった。

免疫指標解析

これまでの研究から、LcS の細胞壁を構成する糖鎖の特徴的な構造が貪食細胞による消化への耐性に寄与し、免疫機能の維持、活性化に重要な役割を担うことが示唆されている (16, 106)。そこで、この糖鎖を含む細胞壁構造を認識するモノクローナル抗体 L8 への反応性 (Fig. 4-8)、細胞壁溶解酵素 (*N*-acetylmuramidase) に対する消化耐性 (Fig. 4-9) を評価した。いずれも、FS と GC-US、GC-JP で同等の結果を示した。さらに J774.1 細胞を用いて各試験サンプル中の LcS による IL-12 産生誘導能を比較した (Fig. 4-10)。FS、GC-US および GC-JP のいずれも濃度依存的に IL-12 産生を誘導し、サンプル間で誘導能に違いはみられなかった。

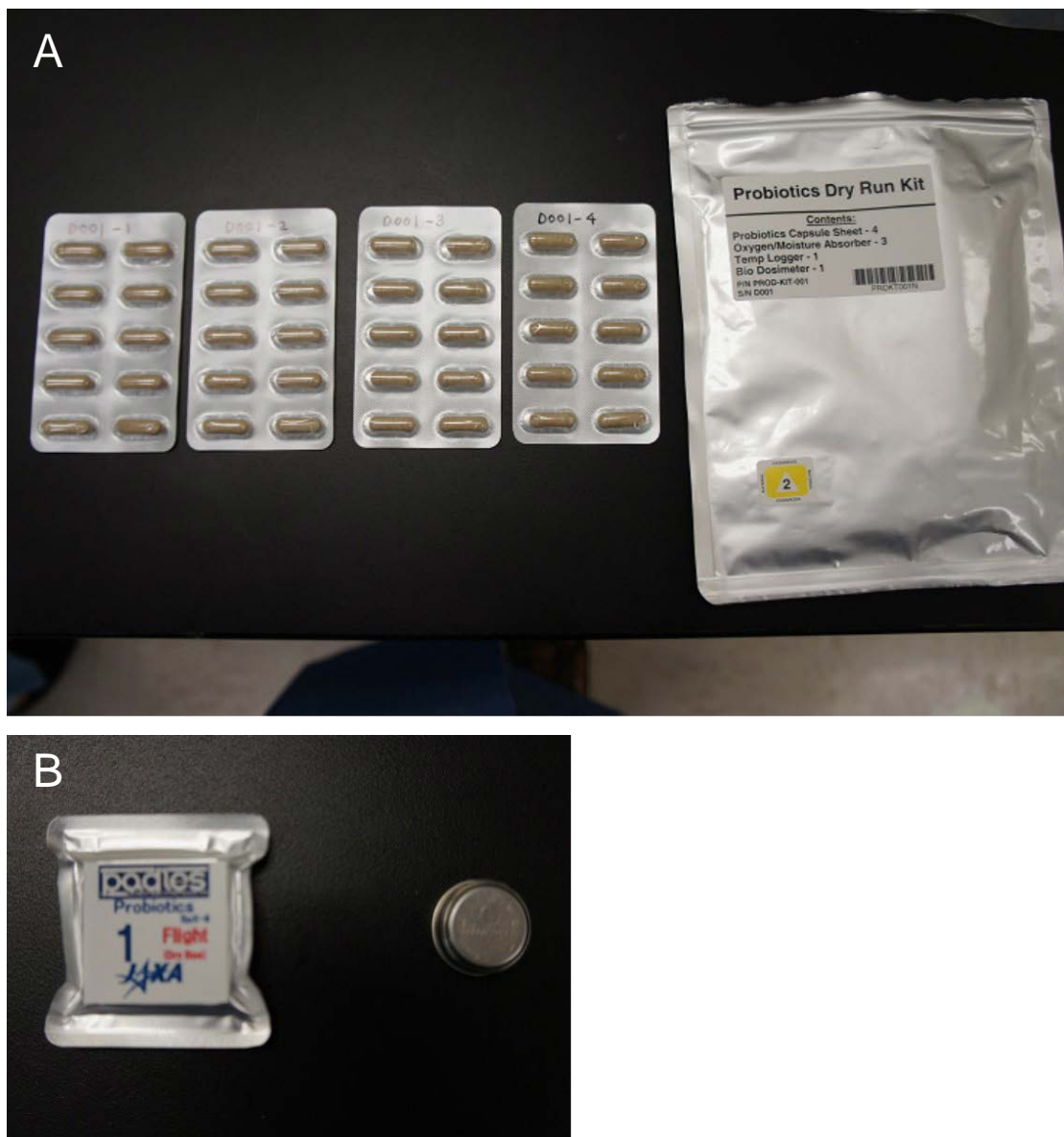


Fig. 4-1. ISS 保管後に地上帰還した試験サンプル (FS)。A：パッケージおよび LcS カプセルの外観、B：バイオパドレス (左) および温度ロガー (右)。

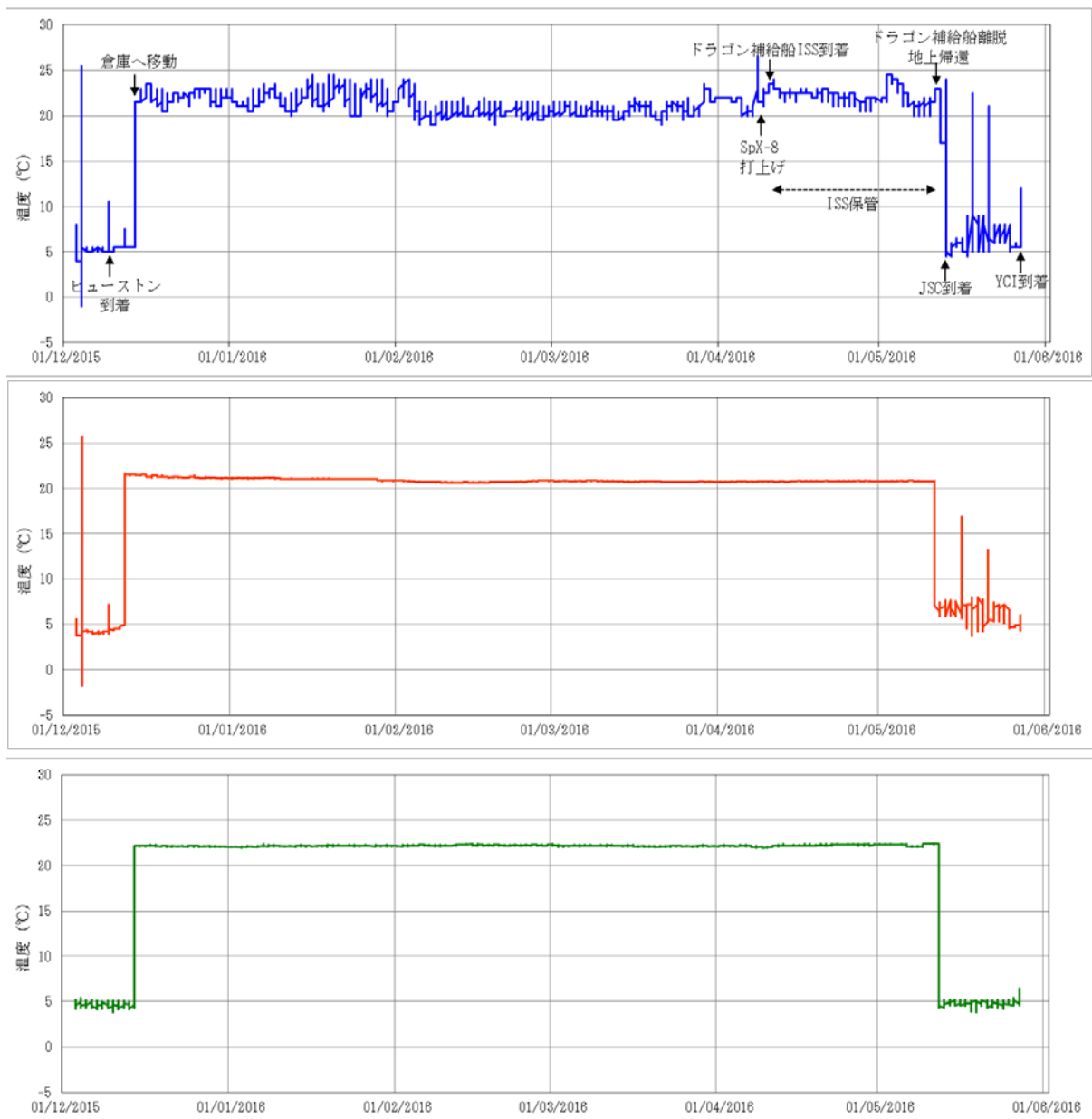


Fig. 4-2. 各試験サンプルの環境温度履歴。上段（青）：FS、中段（オレンジ）：GC-US、下段（緑）：GC-JP。

Table 4-1. ISS 保管中の FS の放射線被曝線量

総吸収線量 (mGy in water)	8.53 ± 0.67
総線量当量 (mSv)	17.08 ± 1.39
吸収線量率 (mGy/day)	0.26 ± 0.02
線量当量率 (mSv/day)	0.52 ± 0.04
平均線質係数	2.00 ± 0.23

FS に含まれていたバイオパドレスの実測値から GC-US に含まれていたバイオパドレスの実測値を差し引いた値であり、ISS 保管中の放射線量を反映している。

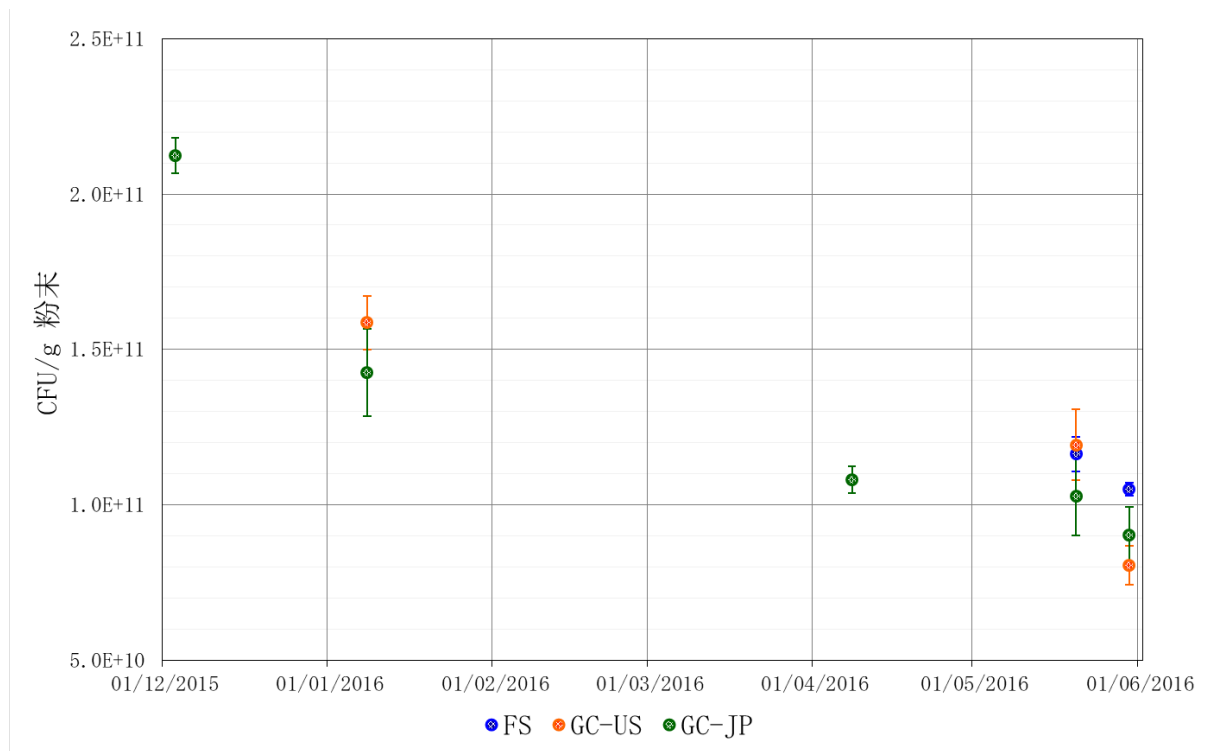


Fig. 4-3. 各試験サンプルに含まれる LcS の生菌数推移。青：FS、オレンジ：GC-US、緑：GC-JP。ドットは平均値、エラーバーは標準偏差を示す (N = 3)。

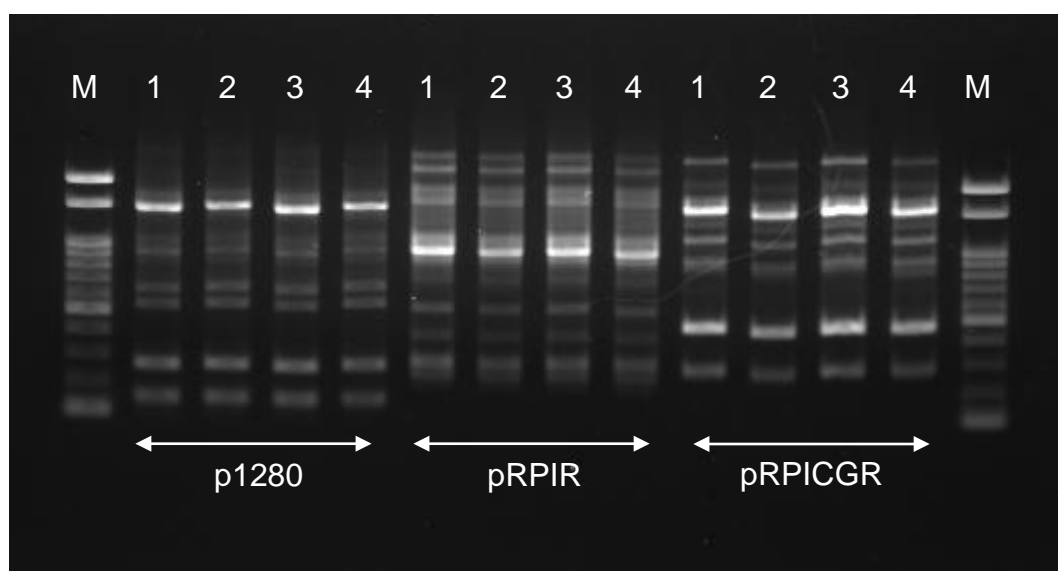
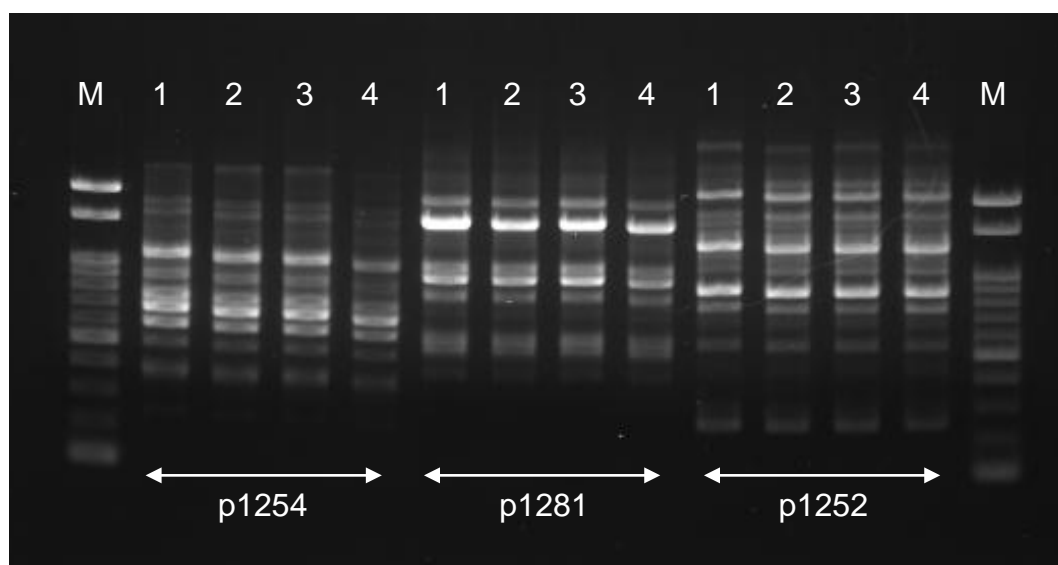


Fig. 4-4. 6 種類のプライマーを用いた各試験サンプルの RAPD 解析によるバンドパターンの写真。M：分子量マーカー、1：製造時、2：FS、3：GC-US、4：GC-JP。

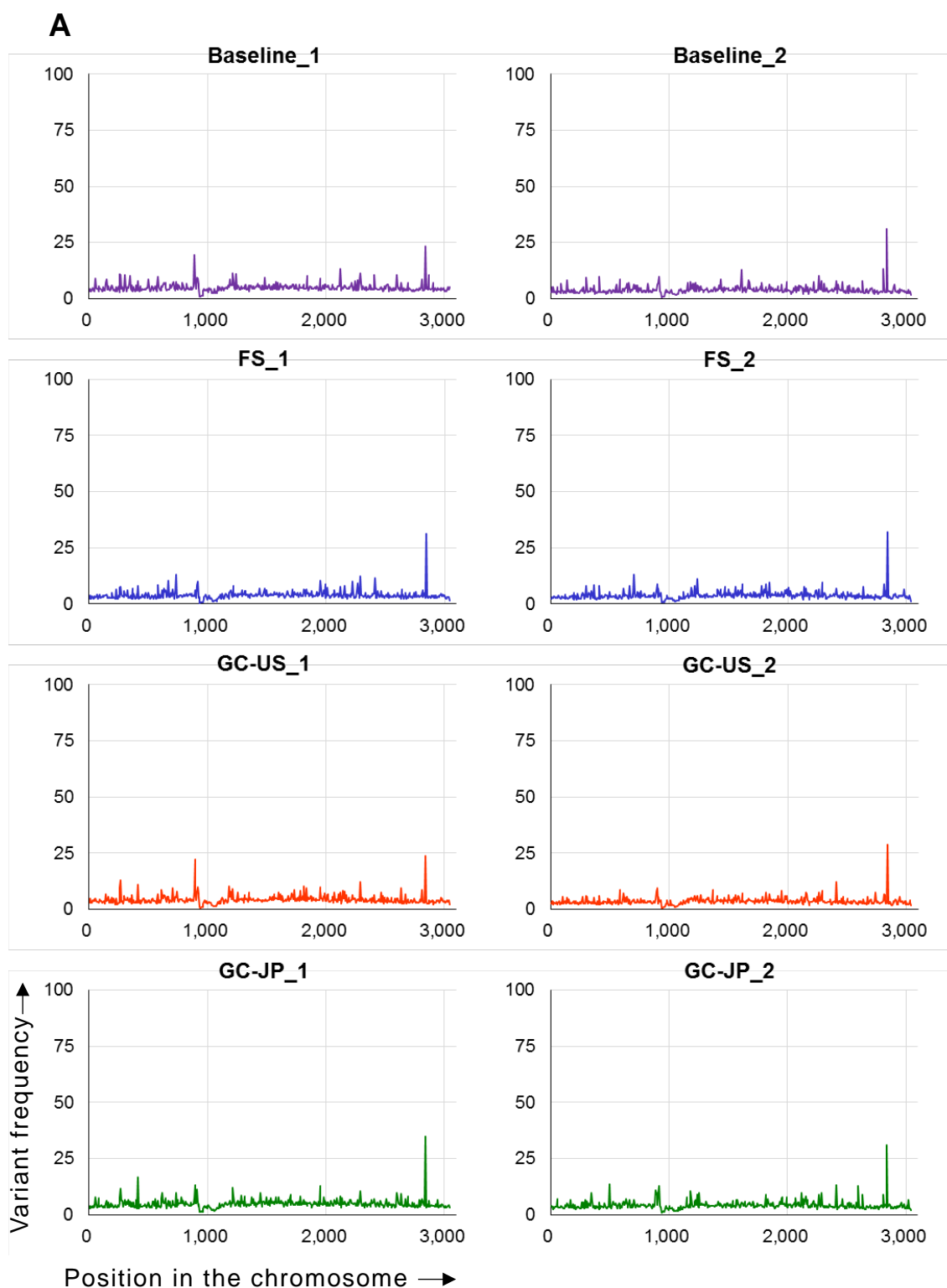


Fig. 4-5. 各試験サンプルに含まれる LcS の Sequence variance 解析結果。A : 染色体、B : プラスミド pLY101、Baseline : 製造時。推定されるコピー数 (3 コピー) を考慮して解析を実施した。

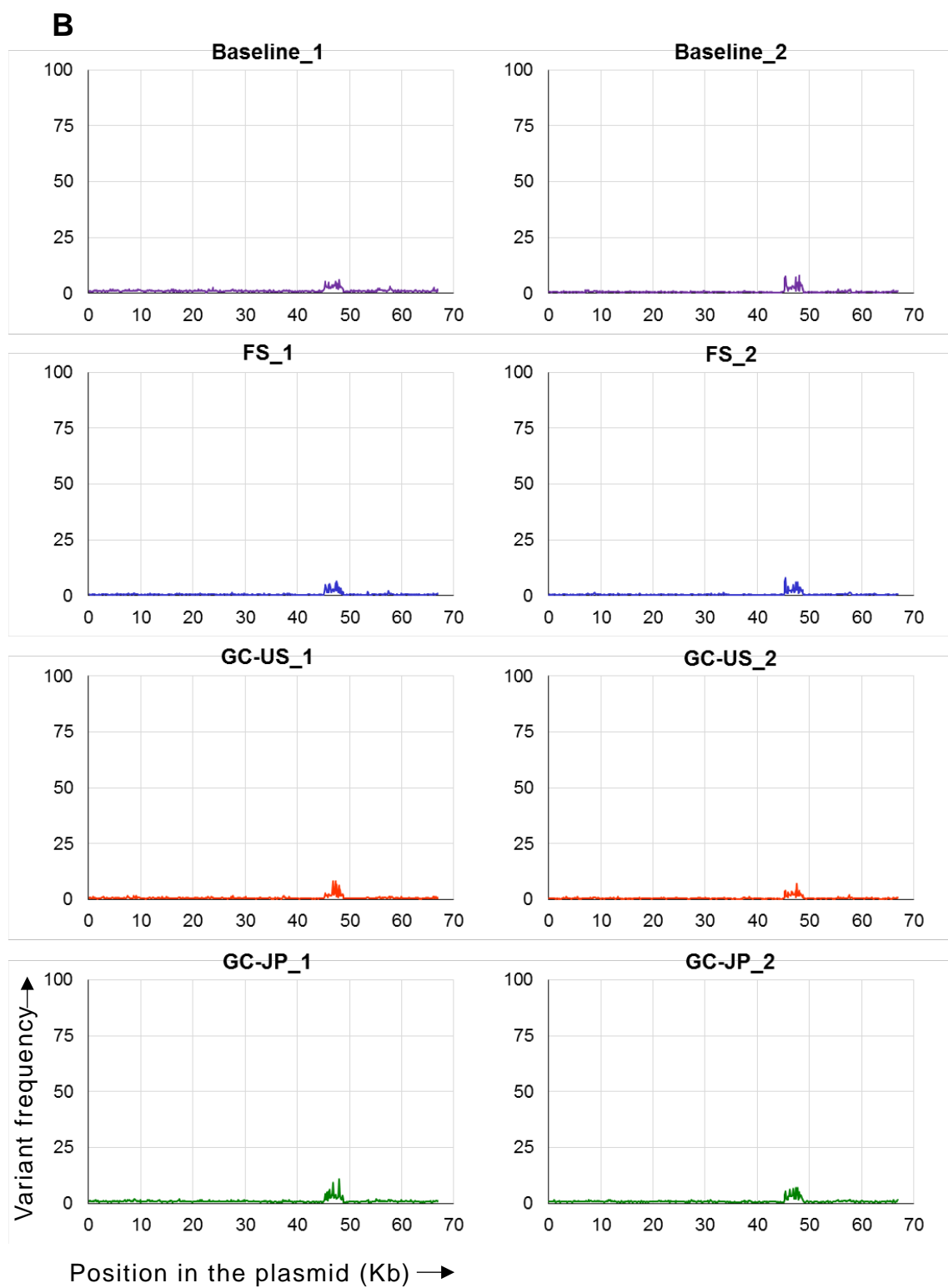


Fig. 4-5. (続き)

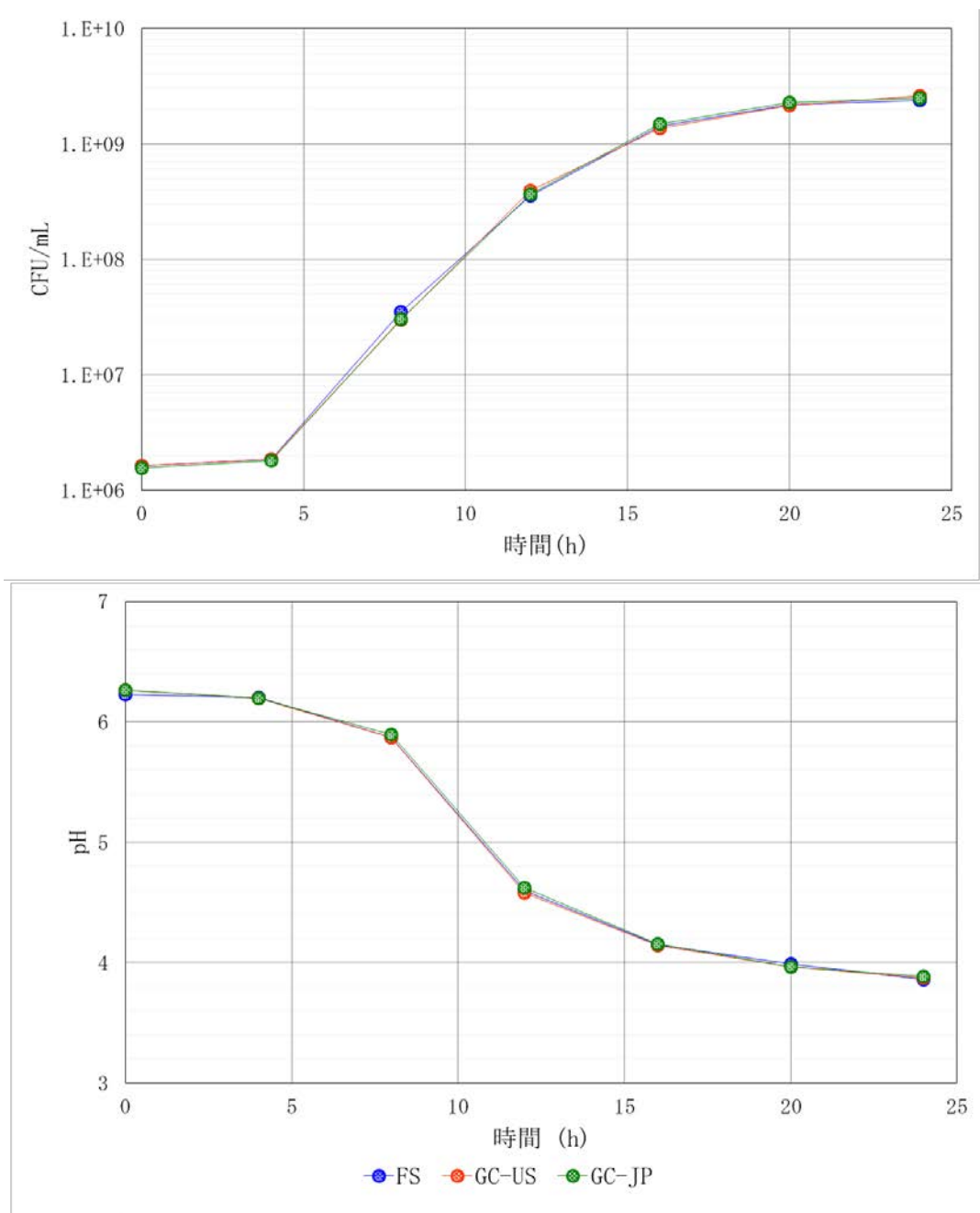


Fig. 4-6. 再培養した試験サンプル中の LcS の生育曲線（上段）および pH 変化（下段）。N = 2 の平均値を示す。

Table 4-2. 各試験サンプル中の LcS の糖資化性評価結果

糖源	FS	GC-US	GC-JP
Glycerol			
Erythritol			
D-Arabinose			
L-Arabinose			
Ribose	+	+	+
D-Xylose			
L-Xylose			
Adonitol	+	+	+
β -Methyl-xyloside			
Galactose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Mannose	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+
Rhamnose			
Dulcitol			
Inositol			
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
α -Methyl-D-mannoside			
α -Methyl-D-glucoside	+	+	+
N-Acethyl-glucosamine	+	+	+
Amygdaline	+	+	+
Arbutine	+	+	+
Esculin	+	+	+
Salicin	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Melibiose			
Saccharose	+	+	+
Treharose	+	+	+
Inulin			
Melezitose			
D-Raffinose			
Amidon			
Glycogen			
Xylitol			
β -Gentiobiose	+	+	+
D-Turanose	+	+	+
D-Lyxose			
D-Tagatose	+	+	+
D-Fucose			
L-Fucose			
D-Arabitol			
L-Arabitol			
Gluconate	w	w	w
2-Keto-gluconate			
5-Keto-gluconate			

+ : 陽性、w : 偽陽性、空欄 : 陰性。

FS

GC-US

GC-JP



Fig. 4-7. API 50 CH strip による各試験サンプルに含まれる LcS の培養後の写真。

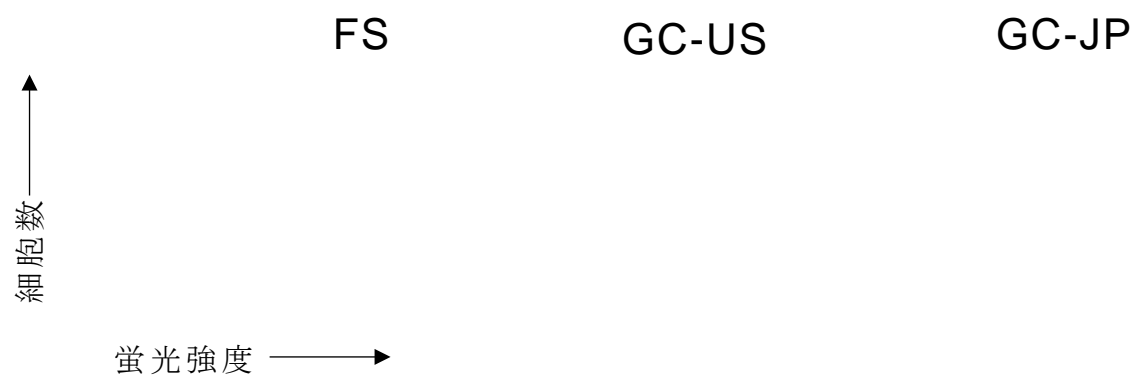


Fig. 4-8. 各試験サンプルに含まれる LcS の LcS 特異的抗体反応後のヒストグラム。濃い灰色は抗体と結合した LcS、薄い灰色は抗体と結合していない LcS を示す。

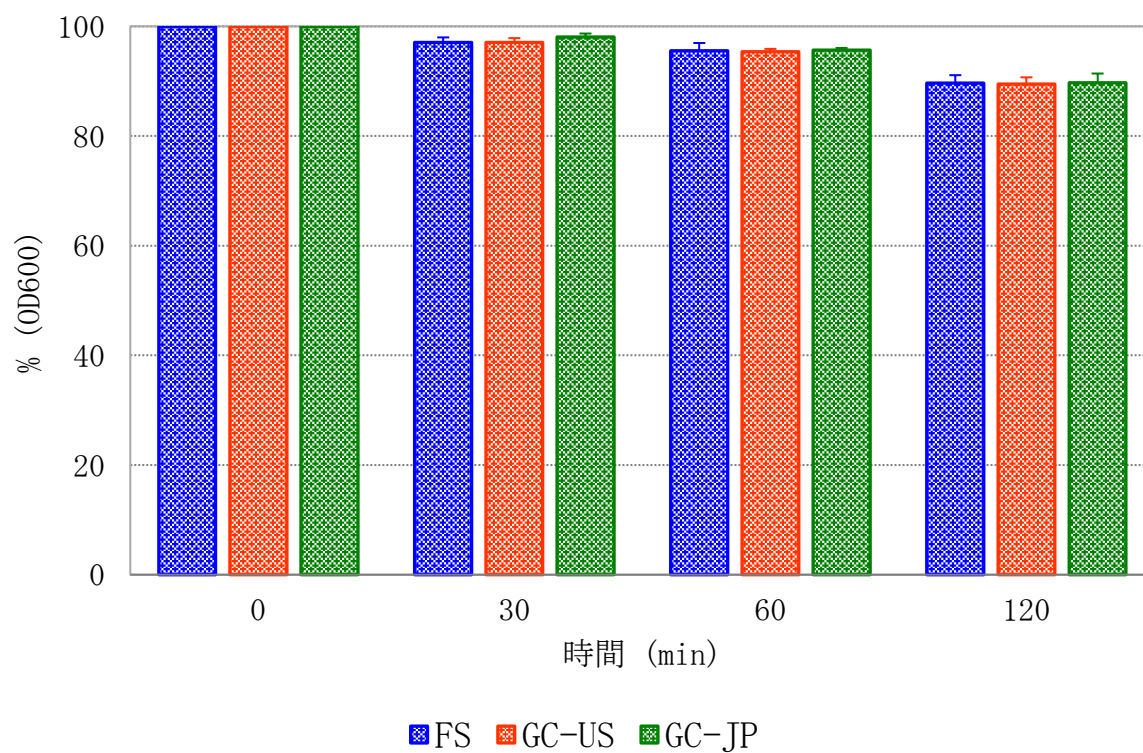


Fig. 4-9. 細胞壁溶解酵素による各試験サンプルに含まれる LcS の消化耐性解析結果。バーは平均値、エラーバーは標準偏差を示す (N = 3)。

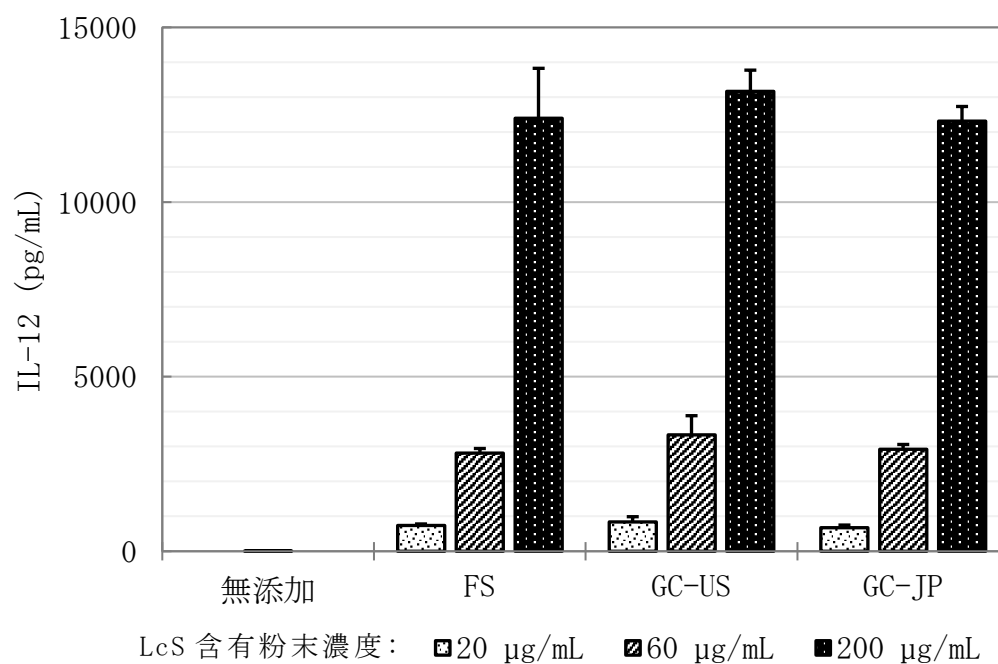


Fig. 4-10. 試験サンプル中の LcS 刺激による IL-12 産生誘導の解析結果。バーは平均値、エラーバーは標準偏差を示す (N = 3)。

4.4 考察

一連の検証により、ISSで約1か月間保管した試験サンプルに含まれるLcSは地上で保管した対照品と同様に安定的に維持されていたことを確認した。筆者の知る限り、本試験以前に宇宙空間でのプロバイオティクスの安定性を検証した例は無い。今回の結果は、これに続く宇宙飛行士を対象とした摂取試験と併せて、宇宙空間におけるプロバイオティクスの活用の道を切り拓く第一歩となる。

ISSでは、微小重力、閉鎖隔離環境および宇宙放射線という地上とは異なる環境要因に晒される。このような環境要因の影響を含めてLcSへの影響を評価することが重要と考えた。今回は、これらのうち実測可能な宇宙放射線をバイオパドレスにより評価し、LcS生菌体への影響が想定される温度環境も温度ロガーにより記録することとした。その他、生菌体に影響を及ぼし得る環境要因として湿度も挙げられるが、試験サンプルのパッケージに乾燥機能付き脱酸素材を同梱したことから湿度は測定しなかった。FSが受けた放射線の吸収線量率、線量当量率はそれぞれ 0.26 ± 0.02 mGy/日、 0.52 ± 0.04 mSv/日であり (Table 4-1)、過去に実施された宇宙実験で報告された値と同等であった (96, 107)。地上で保管されたGC-JPと比較すると約130倍の値であり、ISS船内特有の環境による影響を受けていたことの証となった。また、ISS船内の温度は21℃～23℃で管理されていると報告されており (108)、地上対照品の保管温度設定 (22℃) もこれを参考にした。今回のISS船内の室温実測値は20.0℃～24.5℃の範囲内であり、過去の実績と同等であった。また、地上での室温保管期間を含めた平均温度は21.5℃であり、21℃～22℃で保管されていた地上対照品と十分比較し得ると判断された。

「十分量を摂取したときにヒトに有益な効果をもたらす生きた微生物」と定義されるプロバイオティクスは、摂取する時点において生きた状態で十分な菌数が保たれている必要がある。地上帰還後にFS中のLcS生菌数を測定した結果、 1.05×10^{11} CFU/g 粉末の菌数を維持していた (Fig. 4-3)。地上での保管期間を含め、製造から約6か月後の測定結果であり、地上対照品と比べても同等に保たれていることを確認した。宇宙飛行士を対象とした摂取実験にて、被験者は1 g相当 (5カプセル) のLcS含有粉末を摂取する。地上での対人試験において、1日当たり 4×10^{10} CFU以上のLcSを継続摂取することにより免疫機能の維持、活性化につながることが示されている (17-19, 109)。今回の試験結果から、ISSでも、有益な効果をもたらすと期待される十分量のLcS生菌を摂取可能であると考えられる。

免疫機能に対するLcSの機能性評価のため、その効果の発揮に重要な役割を担う糖鎖を含む細胞壁構造が維持されていること、細胞壁溶解酵素への耐

性を示すこと、そしてマクロファージへの作用により NK 細胞の活性化に寄与する IL-12 の産生を誘導することを *in vitro* 試験系で確認した。その結果、FS に含まれる LcS は地上対照品 (GC-US および GC-JP) と同様に LcS 特異的モノクローナル抗体への反応性、細胞壁溶解酵素への消化耐性および IL-12 の産生誘導を示した (Fig. 4-8、4-9、4-10)。前述の生菌数と併せて、宇宙滞在による免疫機能の低下に対して LcS が効果を発揮することが期待される結果であった。

その他、ISS での保管による LcS の安定性について多角的に検証するため、RAPD 解析および sequence variance 解析による遺伝子解析 (Fig. 4-4、4-5)、糖発酵性解析および再培養時の生育曲線解析による発酵性状解析 (Fig. 4-6、4-7、Table 4-2) を行った。いずれも FS は GC-US および GC-JP と同等の結果を示した。前述のとおり、FS は地上対照品と比べて多くの宇宙放射線を受けていたことが示されているが、本研究の範囲内では、LcS の基本的な性質に対する影響はみられなかった。なお、本研究の結果には、実験手法による解釈の制限がある。宇宙飛行士を対象とした試験では、カプセルに含まれる LcS 全てを宇宙飛行士が摂取することから、1 細胞毎ではなく、1 g 当たり約 10^{11} CFU 含まれる菌の総体として評価することを主眼とした。上記の遺伝子解析もカプセル中の LcS 粉末を培養に供し、単離せず解析を行ったため、1 細胞当たりの変異率を解析するに至っていない。乳酸菌以外の微生物を用いた宇宙実験にて、抗生物質の一つであるリファンピシン (rifampicin) への耐性を指標とした変異率の解析も実施されている (110, 111)。個々のクローンに対するミクロな観点での影響評価を行うためには、更なる検証が必要である。

宇宙空間における微生物研究は主に病原性細菌が用いられており、微生物の挙動が宇宙飛行により変化することが示唆されている。*Salmonella typhimurium* の毒性が増加する (112, 113)、*Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィーム形成が促進される (114)、*Staphylococcus epidermidis* の生残性が低下することが示されている (110)。また、地上にて実施された疑似微小重力モデルを用いた *Lactobacillus acidophilus* に関する 2 つの研究では、好気条件と嫌気条件の違いにより安定性について相反する結果が得られている (115, 116)。これらの研究では培地を用いて活動状態にある微生物の挙動を調べていた。一方、本試験で用いた試験サンプルは LcS を凍結乾燥して水分を極力抑え、代謝等の微生物の活動が生じにくい状態であった。この試験サンプルの形態により ISS 保管中も LcS の活動が抑えられ、菌の性質が安定的に維持されることに寄与していたと推察された。

以上、約 1 か月間の ISS での保管後も試験サンプル中の LcS の生菌数、遺伝情報、発酵性状、免疫調節作用に関連する機能は地上対照品と同様に維持

され、プロバイオティクスとしての基本的性質が保たれることが示された。本試験サンプルを用いることにより、ISS に滞在する宇宙飛行士に対する LcS の機能性評価が可能であり、その結果に基づいて宇宙空間での健康管理にプロバイオティクスを活用していくことが期待される。また、本研究では凍結乾燥した状態で宇宙空間における安定性評価を行ったが、宇宙空間でプロバイオティクスを培養した際の動態変化に関する知見は乏しい。本研究を端緒として、宇宙におけるプロバイオティクスの基礎的な研究も進展すると期待される。

第 5 章 総括

これまで日本国内を中心に LcS の機能性評価が行われており、日本以外の地域や生活習慣、生活環境における LcS の機能性評価に適した評価手法の導入、地域を問わず共通の健康課題に対する LcS の機能性評価に適した評価手法の導入が課題であった。また、一般の生活環境と著しく異なる特殊な環境で生活する人々の健康管理にも LcS を活用していくことが期待される。筆者は、これら課題に対する以下の研究を行った。

第一の研究として、*L. casei/L. paracasei* との類縁種であり、欧州地域にてヒトの糞便からの検出が報告されている *L. rhamnosus* の存在下でも LcS を検出できる新規な乳酸菌鑑別用選択培地の性能評価を行った。これまで日本国内の対人試験で使用されてきた選択培地である LLV 寒天培地では、*L. rhamnosus* が *L. casei/L. paracasei* と類似のコロニーを形成するため、その形態で見分けることは困難であった。そこで *L. casei/L. paracasei* と *L. rhamnosus* による L-ラムノース資化性の違いに着目し、L-ラムノース資化の可否による酸産生の差と酸化還元指示薬である TTC の呈色変化を利用した選択培地として M-RTLTV 寒天培地が開発された。

本寒天培地上にて *L. casei/L. paracasei* は赤色のコロニーを形成するのに対し、*L. rhamnosus* は中央に赤い斑点のある白色のコロニーまたはピンク色のコロニーを形成した。M-RTLTV 寒天培地にて *L. casei/L. paracasei* と *L. rhamnosus* の共存下で培養した結果、同一の培地プレート上でも目視で見分けることが可能であり、各々の菌数を測定することができた。また、MRS-V 寒天培地を用いて培養温度の違いにより *L. casei/L. paracasei* と *L. rhamnosus* の菌数を測る既報の方法と比較して同等の結果が得られ、M-RTLTV 寒天培地の方が目視で簡便に分別定量できることが示された。

さらに、ベルギー居住者を対象とした試験にて、LcS 発酵乳を 1 週間継続飲用した被験者の糞便を M-RTLTV 寒天培地にて培養し、LcS 特異的抗体を用いた ELISA と合わせて糞便中の LcS 菌数測定を行った。結果、M-RTLTV 寒天培地に生育した LcS 様コロニーの大部分が LcS と同定され、目視により鑑別できることを確認した。同培地を用いて、摂取した LcS が生きたまま消化管を通過し、糞便と共に排出されて生菌として回収されることを確認できた。

第二の研究として、便秘症状に対する LcS の有効性を適切に評価するため、医学的根拠に基づく精度の高い評価手法の検討を行った。まず、便秘関連の指標として客観性が高く、他の便秘症状との相関性も示されている硬めの便の排出頻度に着目した。硬めの便の排出を確認するため、便の形状を視覚的に評価可能であり、腸内通過時間との相関関係が証明されている BSFS を採用した。さらに、機能性消化管障害の世界的な診断基準であるローマ III

の機能性便秘に関する診断項目に基づき、排便の 25%以上で硬めの便（BSFS スコア 1 または 2 に該当）が出る人の比率を基準とした解析手法を導入した。ベルギーに居住する便が硬めの健常成人を対象として、LcS 発酵乳の継続飲用による影響をランダム化非飲用対照オープン試験により調べた。LcS 発酵乳群では、非飲用群に比べて排便の 25%以上で硬めの便が出る被験者の比率が有意に低下し、平均 BSFS スコアも有意に改善した。また排便回数および残便感の無い排便回数も増加していた。以上、硬めの便の排出頻度に基づく評価手法による反応性が確認され、LcS 発酵乳の継続飲用による有効性が示された。

硬めの便の排出以外にも便秘症状や便秘に伴う QoL への影響を適切に評価することが求められる。そこで、便秘症状の変化との対応により有効性が実証されている質問票であり、便秘薬の治験における有効性評価への使用実績もある PAC-SYM、PAC-QOL を LcS の機能性評価に用いることを検討した。便秘や痔になりやすいことが報告されている出産直後の女性を対象としたランダム化プラセボ対照二重盲検試験により、LcS 発酵乳の継続飲用が便秘症状や QoL に及ぼす影響を PAC-SYM、PAC-QOL を用いて検証した。結果、LcS 発酵乳群ではプラセボ群に比べて PAC-SYM 総合スコアが有意に改善し、PAC-QOL による排便に対する満足感のスコアも LcS 発酵乳群の方が良好であった。また、プラセボ群では飲用期間中に一定の割合で痔の出血のある被験者が認められたのに対し、LcS 発酵乳群では飲用 4 週目にその割合が減少し、飲用 5 週目以降はほぼ認められなくなった。以上、PAC-SYM および PAC-QOL を用いた評価による反応性が確認され、LcS 発酵乳の継続飲用が出産後の便秘症状や QoL、痔の軽減にも有用であることが示された。

第三の研究として、免疫機能低下などの健康リスクが報告されている ISS に滞在する宇宙飛行士を対象とした LcS の機能性評価を行うため、LcS を凍結乾燥してカプセルに封入した宇宙実験用の試験サンプルを用いて、ISS で保管しても LcS の機能が安定的に維持されるか検証した。同じロットの試験サンプルを日本国内（ヤクルト中央研究所）および米国内（NASA ジョンソン宇宙センター）に同一期間保管し、地上対照品とした。ISS 船内に保管した試験サンプル中の LcS 生菌数、発酵性状解析、遺伝子解析および免疫指標解析を行った結果、いずれの評価項目でも地上対照品と同等であり、ISS 船内でも LcS が安定的に維持されることを確認した。宇宙空間でも LcS のプロバイオティクスとしての基本的性質が保たれ、本試験サンプルを用いることにより、ISS に滞在する宇宙飛行士に対する LcS の機能性評価が可能であることが示された。

本研究の対象とした内容と LcS 機能性の推定メカニズムとの関係を Fig. 5-1 に示す。プロバイオティクスとは「十分量を摂取したときにヒトに有益

な効果をもたらす生きた微生物」である (5-7)。口から摂取した後、胃液や膵液に晒される上部消化管を通過し、生きて腸まで辿り着くことによって腸管内でも代謝活動を行うことが可能となる。第一の研究では、**M-RTL**V 寒天培地を用いた **LcS** の消化管生残性評価手法を構築し、ベルギー居住者を対象とした飲用試験により **LcS** の生残性を確認した。

腸に到達した **LcS** 生菌は代謝活動により酢酸や乳酸を産生する (38)。これらは pH を低下させて腸内環境を改善し、内在する有益菌であるビフィズス菌を増やすなど腸内細菌叢のバランスを良好に保つことに寄与すると考えられる。また、乳酸はクロスフィーディングにより腸内細菌の栄養源となり、発酵によりさらに酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸に変換される (57, 117, 118)。短鎖脂肪酸には、腸管の蠕動運動を促進する作用があることが報告されており、便秘症状の改善に寄与すると推測される (31)。第二の研究では、便秘症状に関連する評価手法の導入検討を行い、**LcS** 発酵乳の継続飲用による効果を確認した。ただし、3.1 の考察にも示したとおり、糞便を用いた短鎖脂肪酸の解析は腸管内における短鎖脂肪酸の動態を反映していない可能性が指摘されており、詳細なメカニズムの検証が課題である。

その他、短鎖脂肪酸は腸上皮細胞の栄養源になること、その細胞をつなぐタイトジャンクションを増強し、腸のバリア機能維持に寄与することが報告されており、特に酪酸の働きが注目されている (56, 57, 118)。腸には人体における免疫細胞の約 6 割が集まっているとされ、腸の機能が正常に保たれることにより、免疫機能も適切に発揮されと考えられる。腸管内にはディフェンシン等の抗菌ペプチドや IgA が分泌され、感染性細菌による侵入を防いでいる (119-121)。**LcS** や腸内細菌が産生する有機酸、短鎖脂肪酸も感染性細菌を抑える働きがある (38, 122)。また、**LcS** はマクロファージ等に貪食され、特徴的な多糖-ペプチドグリカン複合体をもつ細胞壁構造による消化耐性が発揮されることにより貪食細胞の IL-12 産生を誘導し、NK 細胞の活性化を促すことが示唆されている (15-20, 106)。活性化した NK 細胞は、がん細胞やウイルス感染した細胞等を攻撃して身体を守る自然免疫細胞として働く。このように **LcS** は間接的または直接的に腸の状態を良好に保ち、免疫機能の維持・活性化に寄与すると考えられる。免疫機能の低下が報告されている宇宙飛行士に対しても、**LcS** が生きて腸まで届くことにより、これら機能性を発揮することが期待される。その検証を行う前段階として、第三の研究にて宇宙実験用の **LcS** カプセルを ISS で保管した際にも **LcS** の生菌数、発酵性状、免疫調節作用等が安定的に維持されることを確認した。宇宙飛行士を対象とした **LcS** の摂取実験により効果検証を進め、宇宙での健康管理にプロバイオティクスを役立てていくことが期待される。

一連の研究により、多様な集団に対する **LcS** の機能性評価に適用可能な評

価手法が構築され、これらの有用性および LcS の機能性が対人試験により確認された。また、宇宙空間という特殊な環境にて LcS の機能性が維持されることを ISS 船内での保管実験により確認した。これら研究により得られた知見に基づき、日本国内の生活環境とは異なる多様な地域・環境で生活する人々を対象として LcS の機能性評価に関するエビデンスを積み重ねていくことが期待される。そして、有効性が科学的根拠に裏付けられ、安全性の高いプロバイオティクスという食品素材を活用した製品を提供していくことにより、様々な場面での世界の人々の健康管理に貢献していくことが期待される。

また、これらの研究により得られた評価手法等に関する知見は、LcS 以外のプロバイオティクス研究、微生物研究や機能性食品素材研究にも活用できるものである。第一の研究で確認された M-RTL^V 寒天培地の特性は、他の *L. casei*/*L. paracasei* および *L. rhamnosus* の消化管生残性評価や発酵乳製品等に含まれる乳酸菌の品質管理、菌株のスクリーニング等、幅広い応用が期待される。また、消化管生残性に寄与する菌の特徴や胃酸、胆汁酸等に耐えるための菌体内での生理応答メカニズムを追究し、微生物種による差異を明らかにすることにより、腸管内でより高い効果を発揮するプロバイオティクスの開発につなげていくことが考えられる。例えば、得られた知見と遺伝子編集技術を組み合わせ、異なる機能的特徴を持つ微生物に対して消化管生残性に必要な因子を付与することで、個別の健康ニーズに対応するプロバイオティクスを新たに開発し、提供していくことが可能となる。

第二の研究で導入・検証した便秘に関連する評価手法は、LcS 以外のプロバイオティクスや他の機能性素材の有効性評価にも適用可能である。これら手法を用いて便秘に関する素材評価のプロトコルを標準化できれば、どのような対象者にどの素材が有効か、同じ基準で比べることも可能となる。短鎖脂肪酸は便秘症状の緩和に寄与する因子と推定されるが、その他にもプロバイオティクスおよび腸内細菌由来の分泌物や代謝産物が寄与する可能性もある。今回構築・導入した便秘症状等の臨床的な評価と組合わせてヒトの腸管内における生理活性物質の変動を網羅的に解析することができれば、これまで便秘との関連性が示されていなかった新たな因子の発見につながることも考えられる。様々な地域・環境にて生活する人々を対象にこのような研究を積み重ねていくことにより、普遍的に効果を発揮する因子、特定の地域・環境で効果を発揮する因子を見出すことも期待される。

第三の研究で得られた知見は、宇宙におけるプロバイオティクス活用の道を切り拓くものと考えられる。将来的には、宇宙空間で乳酸菌等を培養し、発酵食品として摂取する地産地消型の宇宙食開発も進められる可能性がある。今回の試験サンプルのように凍結乾燥した状態で宇宙船内に持ち込むこ

とにより、使用するまでは安定的に維持されると考えられる。一方、宇宙での環境にて培養した際の乳酸菌の性状変化は知見に乏しく、今後の進展が期待される。さらに本研究を端緒として、宇宙空間での滞在中にヒトが摂取した場合の微生物側および宿主側での生理応答に関する研究が進められ、地上では生じないような宇宙特有の変化が見出されていくことも起こり得る。得られた知見は、宇宙環境に適したプロバイオティクス・素材の開発、さらに機能性宇宙食の開発へと発展していく可能性がある。

本学位論文の内容および得られた研究成果は、今後、プロバイオティクスの機能性発現の詳細メカニズム解明に貢献し、関連分野の更なる研究発展により、人種や生活習慣、生活環境の異なる多様な集団における健康課題の解決に大きく貢献するものと考えられる。

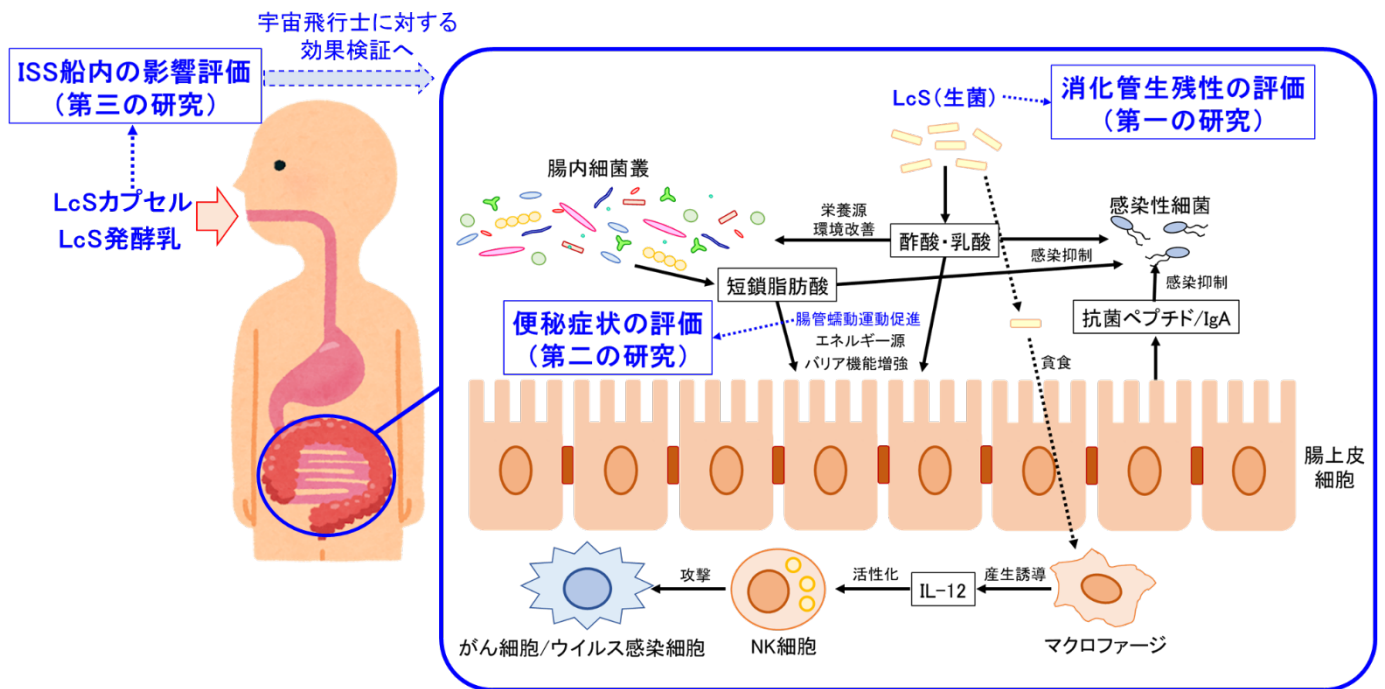


Fig. 5-1. 本研究の対象内容と LcS 機能性の推定メカニズムとの関係

引用文献

1. Tissier H. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). University of Paris. 1900.
2. Metchnikoff I. The Prolongation of Life: Optimistic Studies (Classics in Longevity and Aging). 1907.
3. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. Science. 1965;147:747–8.
4. Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 1989;66:365–78.
5. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 1-4 October 2001.
6. Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 30 April - 1 May 2002.
7. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11:506–14.
8. Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley EM, Sartor RB, Sherman PM, Mayer EA. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. Gut. 2013;62:787–96.
9. Jäger R, Mohr AE, Carpenter KC, Kerkick CM, Purpura M, Moussa A, Townsend JR, Lamprecht M, West NP, Black K, Gleeson M, Pyne DB, Wells SD, Arent SM, Smith-Ryan AE, Kreider RB, Campbell BI, Bannock L, Scheiman J, Wissent CJ, Pane M, Kalman DS, Pugh JN, Ter Haar JA, Antonio J. International Society of Sports Nutrition Position Stand: Probiotics. J Int Soc Sports Nutr. 2019;16:62.
10. Sivamaruthi BS, Kesika P, Suganthi N, Chaiyasut C. A Review on role of microbiome in obesity and antiobesity properties of probiotic supplements. Biomed Res Int. 2019;2019:3291367.
11. Yakult Central Institute for Microbiological Research. *Lactobacillus casei* strain Shirota : intestinal microbiota and human health: new advances. 2013.
12. Yuki N, Watanabe K, Mike A, Tagami Y, Tanaka R, Ohwaki M, Morotomi M. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. Int J Food Microbiol. 1999;48:51–7.
13. Matsumoto K, Takada T, Shimizu K, Kado Y, Kawakami K, Makino I,

- Yamaoka Y, Hirano K, Nishimura A, Kajimoto O, Nomoto K. The Effects of a probiotic milk product containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the defecation frequency and the intestinal microflora of sub-optimal health state volunteers : a randomized placebo-controlled cross-over study. *Biosci Microflora*. 2006;25:39–48.
14. Shioiri T, Yahagi K, Nakayama S, Asahara T, Yuki N, Kawakami K, Yamaoka Y, Sakai Y, Nomoto K, Totani M. The effect of a symbiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain Shirota and transgalactosylated oligosaccharides on defecation frequency, intestinal microflora, organic acid concentrations, and putrefactive metabolites of sub-optimal health state volunteers: a randomized placebo-controlled cross-over study. *Biosci Microflora*. 2006;25:137–46.
 15. Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada S, Nanno M. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:997–1003.
 16. Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Watanabe K, Nanno M. Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. *J Dairy Sci*. 2006;89:3306–17.
 17. Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okumura K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64:2706–8.
 18. Morimoto K, Takeshita T, Nanno M, Tokudome S, Nakayama K. Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in habitual smokers. *Prev Med*. 2005;40:589–94.
 19. Takeda K, Suzuki T, Shimada S-I, Shida K, Nanno M, Okumura K. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Exp Immunol*. 2006;146:109–15.
 20. Shida K, Sato T, Iizuka R, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Miyazaki K, Nanno M, Ishikawa F. Daily intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces the incidence and duration of upper respiratory tract infections in healthy middle-aged office workers. *Eur J Nutr*. 2017;56:45–53.
 21. Ishikawa H, Akedo I, Otani T, Suzuki T, Nakamura T, Takeyama I, Ishiguro S, Miyaoka E, Sobue T, Kakizoe T. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *Int J Cancer*. 2005;116:762–7.
 22. Aso Y, Akaza H, Kotake T, Tsukamoto T, Imai K, Naito S. Preventive effect

- of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group. Eur Urol. 1995;27:104–9.
23. Ohashi Y, Nakai S, Tsukamoto T, Masumori N, Akaza H, Miyanaga N, Kitamura T, Kawabe K, Kotake T, Kuroda M, Naito S, Koga H, Saito Y, Nomata K, Kitagawa M, Aso Y. Habitual intake of lactic acid bacteria and risk reduction of bladder cancer. Urol Int. 2002;68:273–80.
 24. Toi M, Hirota S, Tomotaki A, Sato N, Hozumi Y, Anan K, Nagashima T, Tokuda Y, Masuda N, Ohsumi S, Ohno S, Takahashi M, Hayashi H, Yamamoto S, Ohashi Y. Probiotic beverage with soy isoflavone consumption for breast cancer prevention: a case-control study. Curr Nutr Food Sci. 2013;9:194–200.
 25. Bian L, Nagata S, Asahara T, Rahman MS, Ohta T, Yuki N, Wang C, Takano K, Daibo M, Nomoto K, Yamashiro Y. Effects of the continuous intake of *Lactobacillus casei* strain shirota-fermented milk on risk management of long-term inpatients at health service facilities for the elderly. Int J Probiotics Prebiotics 2011;6:123-32.
 26. Fujita R, Iimuro S, Shinozaki T, Sakamaki K, Uemura Y, Takeuchi A, Matsuyama Y, Ohashi Y. Decreased duration of acute upper respiratory tract infections with daily intake of fermented milk: a multicenter, double-blinded, randomized comparative study in users of day care facilities for the elderly population. Am J Infect Control. 2013;41:1231–5.
 27. Nagata S, Asahara T, Wang C, Suyama Y, Chonan O, Takano K, Daibou M, Takahashi T, Nomoto K, Yamashiro Y. The effectiveness of Lactobacillus beverages in controlling infections among the residents of an aged care facility: a randomized placebo-controlled double-blind trial. Ann Nutr Metab. 2016;68:51–9.
 28. Kato-Kataoka A, Nishida K, Takada M, Kawai M, Kikuchi-Hayakawa H, Suda K, Ishikawa H, Gondo Y, Shimizu K, Matsuki T, Kushiro A, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Miyazaki K, Kuwano Y, Rokutan K. Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota preserves the diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. Appl Environ Microbiol. 2016;82:3649–58.
 29. Takada M, Nishida K, Kataoka-Kato A, Gondo Y, Ishikawa H, Suda K, Kawai M, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Kuwano Y, Miyazaki K, Rokutan K. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal

- models. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28:1027–36.
30. Takada M, Nishida K, Gondo Y, Kikuchi-Hayakawa H, Ishikawa H, Suda K, Kawai M, Hoshi R, Kuwano Y, Miyazaki K, Rokutan K. Beneficial effects of *Lactobacillus casei* strain Shirota on academic stress-induced sleep disturbance in healthy adults: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Benef Microbes.* 2017;8:153–62.
 31. Dimidi E, Christodoulides S, Scott SM, Whelan K. Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation. *Adv Nutr.* 2017;8:484–94.
 32. Bron PA, Kleerebezem M, Brummer R-J, Cani PD, Mercenier A, MacDonald TT, Garcia-Ródenas CL, Wells JM. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br J of Nutr.* 2017;117:93–107.
 33. Sakai T, Oishi K, Asahara T, Takada T, Yuki N, Matsumoto K, Nomoto K, Kushiro A. M-RTL agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. *Int J Food Microbiol.* 2010;139:154–60.
 34. Sakai T, Makino H, Ishikawa E, Oishi K, Kushiro A. Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces incidence of hard or lumpy stools in healthy population. *Int J Food Sci Nutr* 2011;62:423–30.
 35. Sakai T, Kubota H, Gawad A, Gheyle L, Ramael S, Oishi K. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on constipation-related symptoms and haemorrhoids in women during puerperium. *Benef Microbes.* 2015;6:253–62.
 36. Sakai T, Moteki Y, Takahashi T, Shida K, Kiwaki M, Shimakawa Y, Matsui A, Chonan O, Morikawa K, Ohta T, Ohshima H, Furukawa S. Probiotics into outer space: feasibility assessments of encapsulated freeze-dried probiotics during 1 month's storage on the International Space Station. *Sci Rep.* 2018;8:10687.
 37. Davis C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods.* 2014;103:9–17.
 38. Asahara T, Shimizu K, Takada T, Kado S, Yuki N, Morotomi M, Tanaka R, Nomoto K. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota against lethal infection with multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in mice. *J Appl Microbiol.* 2011;110:163–73.
 39. Reid G, Kim SO, Köhler GA. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;46:149–57.
 40. Wall R, Fitzgerald G, Hussey S, Ryan T, Murphy B, Ross P, Stanton C.

- Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract. FEMS Microbiol Ecol. 2007;59:127–37.
41. Nagasaki H, Ito K, Matsuzaki S, Tanaka S. An improved tetrazolium agar medium for testing sugar fermentation in lactobacilli. Nippon Saikingaku Zasshi. 1992;47:511–4.
 42. Tharmaraj N, Shah NP. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. J Dairy Sci. 2003;86:2288–96.
 43. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuijelaars S, Watzl B. PASSCLAIM – gut health and immunity. Eur J Nutr. 2004;43 Suppl 2:II118–II173.
 44. McCrea GL, Miaskowski C, Stotts NA, Macera L, Hart SA, Varma MG. Review article: self-report measures to evaluate constipation. Aliment Pharmacol Ther. 2008;27:638–48.
 45. Heaton KW, Ghosh S, Braddon FE. How bad are the symptoms and bowel dysfunction of patients with the irritable bowel syndrome? A prospective, controlled study with emphasis on stool form. Gut. 1991;32:73–9.
 46. Bassotti G, Bellini M, Pucciani F, Bocchini R, Bove A, Alduini P, Battaglia E, Bruzzi P; Italian Constipation Study Group. An extended assessment of bowel habits in a general population. World J Gastroenterol. 2004;10:713–6.
 47. Garrigues V, Gálvez C, Ortiz V, Ponce M, Nos P, Ponce J. Prevalence of constipation: agreement among several criteria and evaluation of the diagnostic accuracy of qualifying symptoms and self-reported definition in a population-based survey in Spain. Am J Epidemiol. 2004;159:520–6.
 48. O'Donnell LJ, Virjee J, Heaton KW. Detection of pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate. BMJ. 1990;300:439–40.
 49. Probert CJ, Emmett PM, Heaton KW. Intestinal transit time in the population calculated from self made observations of defecation. J Epidemiol Community Health. 1993;47:331–3.
 50. Degen LP, Phillips SF. How well does stool form reflect colonic transit? Gut. 1996;39:109–13.
 51. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. Scand J Gastroenterol. 1997;32:920–4.
 52. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller

- RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*. 2006;130:1480–91.
53. Lacy BE, Mearin F, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simren M, Spiller R. Bowel disorders. *Gastroenterology* 2016;150:1393–1407.
 54. Koebnick C, Wagner I, Leitzmann P, Stern U, Zunft HJ. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastroenterol*. 2003;17:655–9.
 55. Kikuchi H, Tajima T. Correlation between water-holding capacity of different types of cellulose in vitro and gastrointestinal retention time in vivo of rats. *J Sci Food Agric*. 1992;60:139–46.
 56. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001;81:1031–64.
 57. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol*. 2016;7:185.
 58. Mosele JI, Macià A, Motilva M-J. Metabolic and Microbial Modulation of the Large Intestine Ecosystem by Non-Absorbed Diet Phenolic Compounds: A Review. *Molecules*. 2015;20:17429–68.
 59. De Paula JA, Carmuega E, Weill R. 2008. Effect of the ingestion of a symbiotic yogurt on the bowel habits of women with functional constipation. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2008;38:16–25.
 60. Yang YX, He M, Hu G, Wei J, Pages P, Yang XH, Bourdu-Naturel S. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173010 on Chinese constipated women. *World J Gastroenterol*. 2008;14:6237-6243.
 61. Guyonnet D, Schlumberger A, Mhamdi L, Jakob S, Chassany O. Fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 improves gastrointestinal well-being and digestive symptoms in women reporting minor digestive symptoms: a randomised, double-blind, parallel, controlled study. *Br J Nutr*. 2009;102:1654–1662.
 62. Kamm M, Mueller-Lissner S, Talley N, Tack J, Boeckxstaens G, Minushkin O, Kalinin A, Dzieniszewski J, Haeck P, Fordham F, Hugot S, Nault B. Tegaserod for the treatment of chronic constipation: a randomized, double-blind, placebo-controlled multinational study. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:362–72.
 63. Camilleri M, Kerstens R, Rykx A, Vandeplasse L. A placebo-controlled trial of prucalopride for severe chronic constipation. *N Eng J Med* 2008;358:2344–2354.
 64. Quigley EMM, Vandeplasse L, Kerstens R, Ausma J. Clinical trial: the

- efficacy, impact on quality of life, and safety and tolerability of prucalopride in severe chronic constipation – a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;29:315–328.
65. Tack J, van Outryve M, Beyens G, Kerstens R, Vandeplasse L. Prucalopride (Resolor) in the treatment of severe chronic constipation in patients dissatisfied with laxatives. *Gut* 2009;58:357–365.
 66. Chan AO, Lam KF, Hui WM, Hu WH, Li J, Lai KC, Chan CK, Yuen MF, Lam SK, Wong BC. Validated questionnaire on diagnosis and symptom severity for functional constipation in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:483-8.
 67. Frank L, Kleinman L, Farup C, Taylor L, Miner P Jr. Psychometric validation of a constipation symptom assessment questionnaire. *Scand J Gastroenterol.* 1999;34:870-7.
 68. Marquis P, Loge CDL, Dubois D, McDermott A, Chassany O. Development and validation of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40:540–51.
 69. Seymour CA, Chadwick VS, Liver and gastrointestinal function in pregnancy. *Postgraduate Med J.* 1979;55:343–352.
 70. Gjerdingen DK, Froberg DG, Chaloner KM, McGovern PM. Changes in women's physical health during the first postpartum year. *Arch Fam Med.* 1993;2:277–83.
 71. Marshall K, Thompson KA, Walsh DM, Baxter GD. Incidence of urinary incontinence and constipation during pregnancy and postpartum: survey of current findings at the Rotunda Lying-in Hospital. *BJOG* 1998;105:400–402.
 72. Saurel-Cubizolles MJ, Romito P, Lelong N, Ancel PY. Women's health after childbirth: a longitudinal study in France and Italy. *BJOG.* 2000;107:1202–9.
 73. Bradley CS, Kennedy CM, Turcea AM, Rao SSC, Nygaard IE. Constipation in pregnancy: prevalence, symptoms, and risk factors. *Obstet Gynecol.* 2007;110:1351–1357.
 74. Cullen G, O'Donoghue D. Constipation and pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21:807–818.
 75. Derbyshire EJ, Davies J, Detmar P, Changes in Bowel Function: Pregnancy and the Puerperium. *Dig Dis Sci.* 2007;52:324–328.
 76. Saha S, Manlolo J, McGowan CE, Reinert S, Esposti SD. Gastroenterology Consultations in Pregnancy. *J Womens Health.* 2011;20:359–363.
 77. Loder PB, Kamm MA, Nicholls RJ, Phillips RKS. Haemorrhoids: Pathology, pathophysiology and aetiology. *BJS (British Journal of Surgery).*

- 1994;81:946–54.
78. Dennison AR, Paraskevopoulos JA, Kerrigan DD, Shorthouse AJ. New thoughts on the aetiology of haemorrhoids and the development of non-operative methods for their management. *Minerva Chir.* 1996;51:209–16.
 79. Abramowitz L, Sobhani I, Benifla JL, Vuagnat A, Daraï E, Mignon M, Madelenat P. Anal fissure and thrombosed external hemorrhoids before and after delivery. *Dis Colon Rectum.* 2002;45:650–5.
 80. Avsar AF, Keskin HL. Haemorrhoids during pregnancy. *J Obstetrics Gynaecol.* 2010;30:231–7.
 81. Hibberts F, Schizas A. Assessment and treatment of patients with haemorrhoids. *Nurs Stand.* 2010;24:51–6.
 82. Liu N, Mao L, Sun X, Liu L, Yao P, Chen B. The effect of health and nutrition education intervention on women's postpartum beliefs and practices: a randomized controlled trial. *BMC Public Health.* 2009;9:45.
 83. Derbyshire E, Davies J, Costarelli V, Dettmar P. Diet, physical inactivity and the prevalence of constipation throughout and after pregnancy. *Matern Child Nutr.* 2006;2:127–34.
 84. Wanitschke R, Goerg KJ, Loew D. Differential therapy of constipation - a review. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003;41:14–21.
 85. Tack J, Müller-Lissner S, Stanghellini V, Boeckxstaens G, Kamm MA, Simren M, Galmiche JP, Fried M. Diagnosis and treatment of chronic constipation – a European perspective. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23:697-710.
 86. Trottier M, Erebara A, Bozzo P. Treating constipation during pregnancy. *Can Fam Physician.* 2012;58:836-8
 87. Shelton MG. Standardized senna in the management of constipation in the puerperium: A clinical trial. *S Afr Med J.* 1980;57:78–80.
 88. O'Boyle AL, O'Boyle JD, Magann EF, Rieg TS, Morrison JC, Davis GD. Anorectal symptoms in pregnancy and the postpartum period. *J Reprod Med.* 2008;53:151–4.
 89. LeBlanc A, Schneider V, Shackelford L, West S, Oganov V, Bakulin A, Voronin L. Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2000;1:157-60.
 90. Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT, Antropova EA. Immune changes during long-duration missions. *J Leukoc Biol.* 1993;54:189–201.
 91. Rykova MP, Antropova EN, Larina IM, Morukov BV. Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astronautica.*

- 2008;63:697–705.
92. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med.* 2008;79:835–43.
 93. Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb J-L, Tschirhart E, Legrand-Frossi C, Fripiat JP. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J Leukoc Biol.* 2009;86:1027–38.
 94. Stowe RP, Sams CF, Pierson DL. Adrenocortical and immune responses following short- and long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med.* 2011;82:627–34.
 95. Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, Uchakin P, Quiriarte HD, Pierson D, Sams CF, Smith SM. Plasma cytokine concentrations indicate that in vivo hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. *J Interferon Cytokine Res.* 2014;34:778-86.
 96. Nagamatsu A, Masukawa M, Kamigaichi S. Development of the space radiation dosimetry system 'PADLES'. *KEK Proc.* 2006;2006-7:26-36.
 97. Tawara H, Masukawa M, Nagamatsu A, Kitajo K, Kumagai H, Yasuda N. Measurement of a linear energy transfer distribution with antioxidant doped CR-39 correcting for the dip angle dependence of track formation sensitivity. *Jpn J Appl Phys.* 2008;47:7324–7.
 98. Nagamatsu A, Murakami K, Araki S, Kumagai H, Kitajo K, Tawara H. Space radiation dosimetry in low earth orbit by a passive and integrating dosimeter - 'PADLES'. *KEK Proc.* 2008;2008-14:167-77.
 99. Nagamatsu A, Murakami K, Yokota A, Yamazaki J, Yamauchi M, Kitajo K, Kumagai H, Tawara H. Space radiation damage to HDTV camera CCDs onboard the international space station. *Radiation Measurements.* 2011;46:205–12.
 100. Tawara H, Masukawa M, Nagamatsu A, Kitajo K, Kumagai H, Yasuda N. Characteristics of Mg₂SiO₄:Tb (TLD-MSO-S) relevant for space radiation dosimetry. *Radiation Measurements.* 2011;46:709–16.
 101. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Kado Y, Takada T, Matsumoto K, Tanaka R. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:167–73.
 102. Fujimoto J, Matsuki T, Sasamoto M, Tomii Y, Watanabe K. Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain Shirota in human feces with strain-

- specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA. *Int J Food Microbiol.* 2008;126:210-5.
103. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:5137–42.
 104. Endo A, Okada S. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2345-8.
 105. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078–9.
 106. Yasuda E, Serata M, Sako T. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:4746-55.
 107. Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114:5988–93.
 108. Thirsk R, Kuipers A, Mukai C, Williams D. The space-flight environment: the International Space Station and beyond. *CMAJ.* 2009;180:1216–20.
 109. Reale M, Boscolo P, Bellante V, Tarantelli C, Nicola MD, Forcella L, Li Q, Morimoto K, Muraro R. Daily intake of *Lactobacillus casei* Shirota increases natural killer cell activity in smokers. *Br J of Nutr.* 2012;108:308–14.
 110. Fajardo-Cavazos P, Nicholson WL. Cultivation of *Staphylococcus epidermidis* in the human spaceflight environment leads to alterations in the frequency and spectrum of spontaneous rifampicin-resistance mutations in the *rpoB* gene. *Front Microbiol.* 2016;7:999.
 111. Moeller R, Reitz G, Nicholson, the PROTECT Team, Wayne L, Horneck G. Mutagenesis in Bacterial Spores Exposed to Space and Simulated Martian Conditions: Data from the EXPOSE-E Spaceflight Experiment PROTECT. *Astrobiology.* 2012;12:457–68.
 112. Wilson JW, Ott CM, zu Bentrup KH, Ramamurthy R, Quick L, Porwollik S, Cheng P, McClelland M, Tsaprailis G, Radabaugh T, Hunt A, Fernandez D, Richter E, Shah M, Kilcoyne M, Joshi L, Nelman-Gonzalez M, Hing S, Parra M, Dumars P, Norwood K, Bober R, Devich J, Ruggles A, Goulart C, Rupert M, Stodieck L, Stafford P, Catella L, Schurr MJ, Buchanan K, Morici L,

- McCracken J, Allen P, Baker-Coleman C, Hammond T, Vogel J, Nelson R, Pierson DL, Stefanyshyn-Piper HM, Nickerson CA. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:16299-304.
113. Wilson JW, Ott CM, Quick L, Davis R, zu Bentrup KH, Crabbé A, Richter E, Sarker S, Barrila J, Porwollik S, Cheng P, McClelland M, Tsaprailis G, Radabaugh T, Hunt A, Shah M, Nelman-Gonzalez M, Hing S, Parra M, Dumars P, Norwood K, Bober R, Devich J, Ruggles A, CdeBaca A, Narayan S, Benjamin J, Goulart C, Rupert M, Catella L, Schurr MJ, Buchanan K, Morici L, McCracken J, Porter MD, Pierson DL, Smith SM, Mergeay M, Leys N, Stefanyshyn-Piper HM, Gorie D, Nickerson CA. Media ion composition controls regulatory and virulence response of *Salmonella* in spaceflight. Ausubel FM, editor. *PLoS One*. 2008;3:e3923.
 114. Kim W, Tengra FK, Young Z, Shong J, Marchand N, Chan HK, Pangule RC, Parra M, Dordick JS, Plawsky JL, Collins CH. Spaceflight promotes biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2013;8:e62437.
 115. Castro-Wallace S, Stahl S, Voorhies A, Lorenzi H, Douglas GL. Response of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 to low-shear modeled microgravity. *Acta Astronautica*. 2017;139:463–8.
 116. Shao D, Yao L, riaz M shahid, Zhu J, Shi J, Jin M, Huang Q, Yang H. Simulated microgravity affects some biological characteristics of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:3439–49.
 117. Bourriaud C, Robins RJ, Martin L, Kozlowski F, Tenailleau E, Cherbut C, Michel C. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol*. 2005;99:201–12.
 118. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016 03;7:189–200.
 119. Chairatana P, Nolan EM. Defensins, lectins, mucins, and secretory immunoglobulin A: microbe-binding biomolecules that contribute to mucosal immunity in the human gut. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017;52:45–56.
 120. Nakamura K, Sakuragi N, Takakuwa A, Ayabe T. Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Biosci Microbiota Food Health*. 2016;35:57–67.
 121. Bunker JJ, Bendelac A. IgA Responses to Microbiota. *Immunity*. 2018

- 21;49:211–24.
122. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011;469:543–7.

乳酸桿菌の分類表記について

2020 年 4 月 15 日に International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 誌にて発表された Zheng らの報告により、*Lactobacillus* 属は 25 種類の異なる属に再分類された。しかし本学位論文では、各研究が実施された当時における乳酸桿菌の学術的分類に従い、属名の表記を *Lactobacillus* に統一した。

謝辞

本論文を作成するにあたり、主査として多くのご指導・ご支援を賜りました東京薬科大学生命科学部・応用生命科学科・食品科学研究室の熊澤 義之教授に厚く御礼申し上げます。また、副査としてご助言・ご指導を賜りました東京薬科大学生命科学部・応用生命科学科・生命エネルギー工学研究室の渡邊 一哉 教授、環境応用動物学研究室の高橋 勇二 教授、生命医科学科・免疫制御学研究室の浅野 謙一 准教授に御礼申し上げます。

本研究を実施する機会を与えてくださいました株式会社ヤクルト本社の石川 文保 中央研究所長・取締役専務執行役員、南野 昌信 中央研究所副所長・常務執行役員、長岡 正人 執行役員、田中 隆一郎 元中央研究所長、非営利法人ヤクルト本社ヨーロッパ研究所の澤田 治司 社長に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行、学術論文の作成にあたり、東京農業大学生命科学部・分子微生物学科の野本 康二 教授、元中央研究所の久代 明 博士、中央研究所・研究管理センターの長南 治 所長、中央研究所・微生物研究所の大石 憲司 副主席研究員には数多くのご助言・ご指導を賜りました。また、微生物研究所の石川 英司 主任研究員、牧野 博 指導研究員、久保田 博之 指導研究員、研究管理センターの秋山 拓哉 指導研究員、ヨーロッパ研究所の Agata Gawad 研究員、杉田 晴子氏には、ベルギーでの研究活動から生活に至るまで、温かいご支援をいただきました。

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構（JAXA）・有人宇宙技術部門・宇宙医学生物学研究グループの古川 聡 グループ長、筑波大学の太田 敏子 名誉教授、筑波大学医学医療系の森川 一也 教授、JAXA の大島 博 技術領域主幹には、本研究の宇宙実験を実施するにあたり貴重なご助言・ご指導を賜りました。その他、宇宙実験に携わった株式会社ヤクルト本社および JAXA の共同研究者・関係者の皆様には、多方面から研究の実施を支えていただきました。心より御礼申し上げます。

最後に、子供の頃から温かく成長を見守り育ててくれた両親と姉、どんなときでも明るい笑顔で心身ともに支え続けてくれた妻と子供たちに心から感謝します。