

報 文

GABA 含有漬物摂取による女子学生の腸内環境の改善

山本周美<sup>1</sup>、西村沙矢香<sup>1</sup>、小林由佳<sup>1</sup>、瀧井幸男<sup>2</sup>

インフォームドコンセントが得られた健康な女子大生 56 名（平均年齢 18.3 歳）を便秘群、非便秘群の 2 群に分け、*Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) subsp. *coagulans* により乳酸発酵させた漬物食品摂取後の便秘改善効果を検討した。GABA 含有漬物摂取後、摂取前は排便後に残便感を感じるものが多い便秘群において摂取後は減少し、何も感じないものが増加することが観察された。すなわち GABA 含有漬物の摂食により、若干の排便日数の増加、便の形状の改善、排便後の感覚の改善が見られ、総体的に緩やかな便秘改善効果が見出された。

(投稿日:2011.9.14 , 受理日:2011.12.26)

キーワード: gamma-aminobutyric acid (GABA), 便秘, 漬物, *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) subsp. *coagulans*

1. はじめに

ヒト腸管内は数百種類の微生物フローラより構成され、宿主の健康増進維持に貢献しているが、その内容は宿主の年齢や食事内容により変化する<sup>1,2)</sup>。これは *Clostridium* 属細菌や *Bifidobacterium* 属乳酸菌をはじめとする多種多様な微生物が互いに共生/拮抗関係を保ちながら生息しているからである<sup>3,4)</sup>。

近年若年世代を中心に、糖質摂取の減

少、脂質と動物性タンパク質摂取の増加という西欧型ライフスタイルが顕著になり、腸内環境の悪化による大腸がん発症リスクの増加が懸念されている<sup>5-7)</sup>。適正な便通は健康を保持増進するが、不快な症状を与える便秘は種々の複雑な原因で発生するため完治しにくい<sup>1)</sup>。特に高齢者や精神疾患者では深刻な問題となっている<sup>8-11)</sup>。

乳酸菌飲料や大豆オリゴ糖食品には元来、整腸効果のある食物繊維が含まれ<sup>12)</sup>、それ以外に生理活性物質としてアミノ酸類、ビタミン類、GABA などが強化されたものがある<sup>13-15)</sup>。これらを日々三度の食生活で継続的に摂取できれば、ヒト腸内環境の改善に役立つ食品素材となりうるかもしれない。GABA は哺乳類、微生物等ほとんどすべての生物体内でグルタミン酸脱炭酸酵素

<sup>1</sup> 武庫川女子大学短期大学部食生活学科

(〒663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

<sup>2</sup> 京都学園大学バイオ環境学部バイオサイエンス学科(〒621-8555 京都府亀岡市曾我部町南条大谷 1-1)

\*筆頭著者連絡先 E-mail:  
syoshida@mukogawa-u.ac.jp

[L-glutamic acid decarboxylase (GAD) : EC 4.1.1.15 ]の作用によって、グルタミン酸から生成される非タンパク質構成の遊離型アミノ酸である<sup>16)</sup>。微生物界では *Lactobacillus* 属乳酸菌を中心に、GAD の分布<sup>17-20)</sup>および GAD 遺伝子の発現に関する研究成果<sup>21-22)</sup>が集積されてきている。

本研究では、乳酸菌 *L. brevis* subsp. *c* *oagulans* を用いて発酵させた GABA 含有漬物を摂取した女子学生の便通に対する改善効果を検討した。

## 2. 実験方法

### 2-1 菌株の培養と菌数測定

ルイ・パスツール研究所(京都市)から譲られた *L. brevis* subsp. *coagulans* は、株式会社西利(京都市)で MRS 培地 (Difco) あるいは GYP (グリセロール、酵母エキス、ペプトン含有) 基本培地<sup>23)</sup>を用いて 30°C で継代培養された。試験食試料中の指標菌として乳酸菌、一般生菌、大腸菌を選択した。菌数測定については、乳酸菌検査用 BCP (bromocresol purple) 加プレートカウント寒天培地、一般生菌検査用標準寒天培地および大腸菌群検査用デスオキシコーレイト寒天培地を用いて 30°C で 2 日間培養した<sup>23)</sup>。寒天平板に生じたコロニー(生菌)は cfu (colony forming unit) として、その対数平均値±標準偏差 (Log 菌数/80g 試料) で表した<sup>24)</sup>。

物等ほとんどすべての生物体内でグルタミン酸脱炭酸酵素 [L-glutamic acid decarboxylase (GAD) : EC 4.1.1.15 ]の作用によって、グルタミン酸から生成される非タンパク質構成の遊離型アミノ酸である<sup>16)</sup>。微生物界では *Lactobacillus* 属乳酸菌を中心に、

GAD の分布<sup>17-20)</sup>および GAD 遺伝子の発現に関する研究成果<sup>21-22)</sup>が集積されてきている。

本研究では、乳酸菌 *L. brevis* subsp. *c* *oagulans* を用いて発酵させた GABA 含有漬物を摂取した女子学生の便通に対する改善効果を検討した。

### 2-2 予備試験食試料中の指標菌と菌数測定

内芯部を除いた白菜 80g を水道水で洗浄後、5% の滅菌食塩水中 4°C で 24 時間浸漬しペーパータオルで水分を除いたものを下漬け白菜とした。これを 120 ml の GYP 基本培地に移し、1 晩前培養した *L. brevis* subsp. *coagulans* を 1.0% (v/v) になるように加え 96 時間 30°C で培養した。24 時間ごとに指標菌の菌数測定を行った(表 2)。

### 2-3 L-乳酸の測定

乳酸脱水素酵素及びグルタミン酸脱水素酵素の共役作用を組み合わせた酵素分析法に従って求めた<sup>25)</sup>。

### 2-4 GABA 含有量の測定

試験食/プラセボ食中の GABA 含量は、試験食配布開始日(図 1)に Shin-pack Isc-07Na を装備した島津クロマトグラフ LC-9A アミノ酸分析により同定した<sup>26)</sup>。

### 2-5 試験食/プラセボ食/非加熱食各包装単位の作製

披験者 1 人あたり白菜 80g を 1 食分の包装単位とする試験食及びプラセボ食は株式会社西利洛西工場に於いて 6 回 (I - VI 期) に分けて製造された(図 1)。内芯部を除いた白菜 6.8 kg を水道水で洗浄後、5% の滅菌

食塩水中 4℃で 24 時間浸漬した(下漬け白菜)。GYP 基本培地で1晩前培養した *L. brevis subsp.coagulans* を下漬け白菜の半量 (3.4 kg) に対して、1.0% (v/v) になるように加え 48 時間 30℃で保温した。次いで調味液 (摩り下ろしショウガ 7.4%、みりん 3.7%、醤油 44.9%、レモン果汁 3.5%、摩り下ろしカブラ 37.5%) に 24 時間浸漬後、80g ごとに切り分けて滅菌済みの耐熱性フィルムシート袋に封入した。これらを 80℃で 20 分間、加熱して[試験食包装単位]とした。下漬け白菜の残り半量(3.4 kg)を同一成分の調味液に一昼夜浸漬し、同様に 80℃で 20 分間、加熱し包装したものを[プラセボ食包装単位]とした。試験食のうち 80℃で 20 分間の加熱をしないものを[非加熱食包装単位(コントロール)]とした。

## 2-6 試験食配布・摂取・指標菌の菌数測定日程

試験は前観察期間 1 週間、摂取期間 2 週間、後観察期間 1 週間の計 4 週間、披験食/プラセボ食摂取は 2 種の漬物の並行群間比較試験とした(図1)。予備を含む 40 包の試験食包装単位、予備を含む 30 包のプラセボ食包装単位は I -VI 期の 6 回に分けて、午前 8 時-9 時、西利洛西工場より武庫川女子大学に冷蔵搬送した。初回 I 期では、被験者手渡し日(火曜日)に、火曜日と水曜日の 2 食分を配布した(図1)。摂取日が日曜日をはさむ III 期と VI 期では、土曜日から月曜日までの 3 日分を配布した。I 期の菌数測定は、摂取開始日(第一火曜日)と最終摂取日(第一水曜日)に実施した(図 1)。これらの配布、指標菌の菌数測定は VI 期まで計 2 週間継続した。

- (1) 倫理委員会開催 ⇒ 被検者のリクルート ⇒ 説明・同意取得
- (2) 摂取前に観察期間を置く
- (3) アンケート調査結果による振り分け(便秘群/非便秘群)
- (4) I 期 ~ VI 期 試験食摂取
- (5) 摂取後に観察期間を置く

期	配布日	摂取日	菌数測定日
I	第1週火曜日	第1週火曜日/第1週水曜日	第1週火曜日/第1週水曜日
II	第1週木曜日	第1週木曜日/第1週金曜日	第1週木曜日/第1週金曜日
III	第1週土曜日	第1週土曜日/第1週日曜日/第2週月曜日	第1週土曜日/第2週月曜日
IV	第2週火曜日	第2週火曜日/第2週水曜日	第2週火曜日/第2週水曜日
V	第2週木曜日	第2週木曜日/第2週金曜日	第2週木曜日/第2週金曜日
VI	第2週土曜日	第2週土曜日/第2週日曜日/第3週月曜日	第2週土曜日/第3週月曜日

図 1 試験スケジュールと包装単位

被験者学生には保冷袋を供与し、午前中に研究室に試験食/プラセボ食を取りに来るよう指示した。摂取期間中は、試験食あるいはプラセボ食1包装単位を、1日1回食事時に摂取させた。被験者には試験食を毎日摂取することを除いて、それまでの食生活、運動などの日常生活を変えることの無いように指示した。前観察期間では各 pack の微生物フローラおよび菌数の点検調製および指標菌の菌数測定、後観察期間では、医師や管理栄養士が被験者学生の食生活指導を行った。

## 2-7 検査方法

対象となる被験者は、武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科の2年生の有志56名(平均年齢18.3歳)である。便秘群、非便秘群の分別にあたっては、以下の3つの条件を満たすものを便秘群、満たさないものを非便秘群とした(表1)。

条件①便が硬く、排便が困難であり、排便がまれ(数日間に1回程度)である場合は、便秘とする。

条件②毎日排便があっても便が硬くて残便感がある場合や、排便に苦痛を感じる場合は便秘とする。

条件③2-3日に1回の排便でも排便状態が

普通で、本人が苦痛を感じない場合は便秘としない。

すべての身体的計測は、武庫川女子大学健康科学館で健康スポーツ科学科に所属する医師・看護師の管理の下に実施した。研究に協力した助手、大学院生はいずれも管理栄養士の資格を有していた。

### (1) 身長および体成分分析

身長は摂取1週間前のみ測定を行った。体成分分析は Biospace 社製の In Body 3.2を用いて、摂取1週間前、摂取2週間後の計2回測定した。

### (2) 食物摂取頻度調査

食事内容、食習慣、生活状況などをエクセル栄養君 Ver.2 FFQg(建帛社)を用いて解析した。

### (3) 排便状況および糞便性状の調査

被験者に毎日の排便状況および糞便性状に関する記録を依頼した。

### (4) 統計処理

数値結果は平均値±標準偏差で表示した。統計解析は SPSS 11.0J for Windows (SPSS Inc.)を使用した。便秘群と非便秘群の被験者背景の比較には対応のないt検定、摂取による排便後の感覚、便の形状変化にはマン・ホイットニのU検定を用いた。

表1 被験者背景

項目	便秘群	非便秘群	<i>p</i>
被験者数	26	29	ns
年齢	18.3±0.5	18.2±0.4	ns
体重 (kg)	53.4±7.0	54.1±7.4	ns
身長 (cm)	157.2±5.1	158.7±5.8	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.5±2.4	21.4±2.6	ns
体脂肪率 (%)	28.8±5.6	28.5±4.9	ns
排便回数(回/週)	3.8±1.8	5.7±1.1	<0.01

(Non-pair t-test)

### 3. 結果

#### 3-1 予備試験食試料中の指標菌と菌数測定

*L. brevis* subsp.*coagulans* による発酵過程で、乳酸菌の増加とともに乳酸の生成がおこった。これと並行して試料の pH が低下し、共存する大腸菌の菌数は大幅に減少することがわかった(表 2)。したがって試験食実施の日程 (I -VI期) に合わせて 48 時間培養後の試料を被験食/プラセボ食用として供した。一般生菌用培地上に出現したコロニーのほとんどは顕微鏡観察から *L. brevis* subsp.*coagulans* とみなされる特徴的な形態を提示していた。

表 2 予備試験食における指標菌の菌数

培養時間 (h)	pH	大腸菌 (cfu/ml)	一般生菌 (cfu/ml)	乳酸菌 (cfu/ml)	乳酸生成 (g/l)
0	6.1	1.00E+01	8.10E+05	8.30E+03	0.01
24	5.9	7.70E+02	9.30E+07	3.90E+05	0.14
48	3.2	< 10	1.30E+07	2.40E+08	2.25
72	3.3	< 10	2.70E+08	2.60E+08	2.74
96	3.2	< 10	2.70E+08	2.60E+08	2.94

(3 点の平均値)

#### 3-2 試験食群/プラセボ食群中の GABA 含有量と塩分濃度

被験者に配布した I -VI期 6 回分とも、試験食中の GABA 量は 2 週間の期間を通してほぼ一定であった。一方プラセボ食群では、もともと原材料に含まれる閾値を示した。一方、風味官能性に影響を及ぼす塩分濃度は両者とも変わらなかった(表 3)。

#### 3-3 試験食群/プラセボ食群中の微生物フローラ

I -VI期の 6 回にわたって両食群とも大腸菌数は検出限界以下であった。一方、非加

表 3 試験食/プラセボ食の GABA 含有量と塩濃度

期	試験食		プラセボ食	
	GABA (mg/80g)	塩濃度 (%)	GABA (mg/80g)	塩濃度 (%)
I	200.1	1.5	14.1	1.9
II	196.7	1.3	12.6	1.4
III	210	1.3	16.4	1.5
IV	198.1	1.1	11.4	1.1
V	211.8	1	11.4	1.1
VI	205.6	1.1	10.7	1.2

(3 点の平均値)

熱処理群では $10^5$  から $10^6$  個の菌数を示す乳酸菌群は、試験食/プラセボ食とも10-100個の範囲内であり、両者に大差がなかった(表4)。

### 3-4 被験者の背景

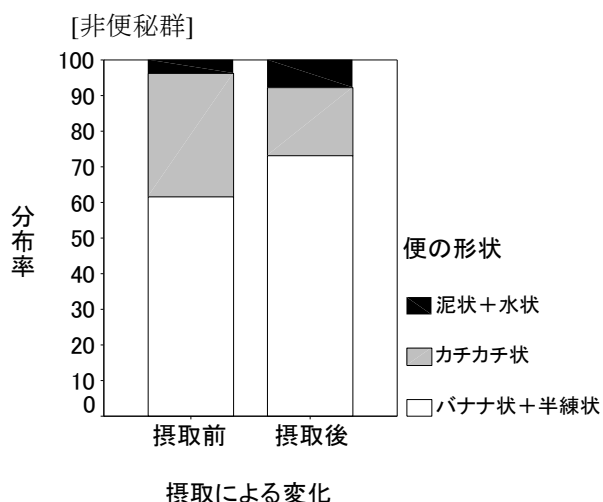
便秘群、非便秘群において、年齢、身長、体重、BMI、体脂肪率に有意な差はなかったが、1週間あたりの排便回数は便秘群において有意に少なかった(表1)。排便日数は、非便秘群においては摂取前 $5.7 \pm 1.1$ 日、摂取後 $5.7 \pm 1.6$ 日と変化は無かったが、便秘群において、摂取前 $3.8 \pm 1.8$ 日、摂取後 $4.5 \pm 1.6$ 日と有意な増加がみられた( $p=0.037$ )。

### 3-5 便の形態

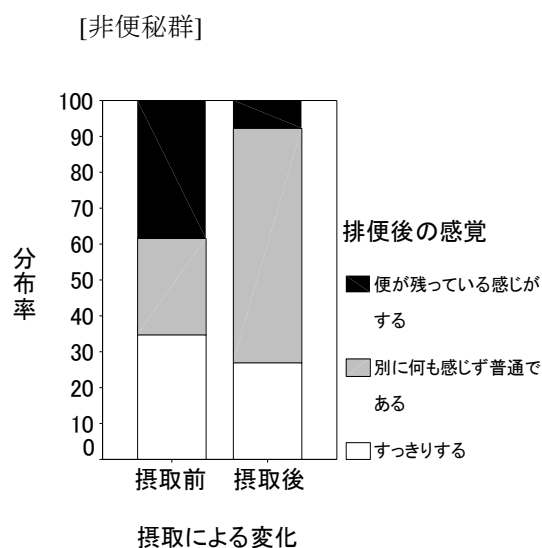
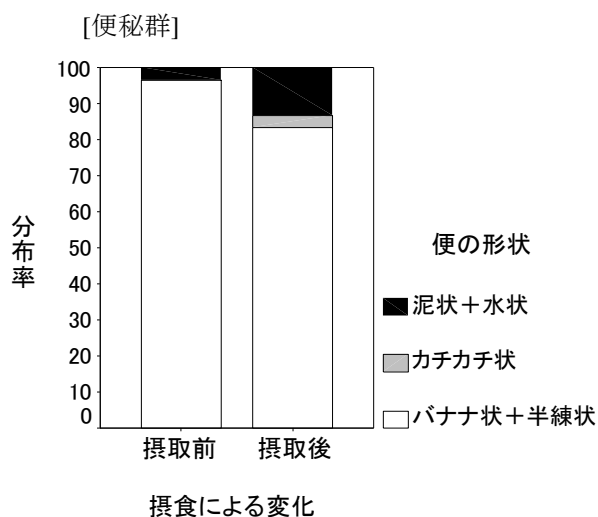
便秘は、便が長時間大腸に貯留されるため、水分が失われ固くなる傾向がある。摂取による便の形状の変化を表した(図2)。便秘群において、カチカチ便が減少し、理想的な便の形状であるバナナ状あるいは半練状の便が増えていた。下痢を特徴づける泥状・水状の便が両群において増加しているのは、白菜に含まれる食物繊維の効果ではないかと考えられる。

表4 試験食/プラセボ食の菌数

期	初回摂取日		最終摂取日	
	大腸菌群	乳酸菌群	大腸菌群	乳酸菌群
I期				
プラセボ食群	10以下	10以下	1.40E+02	10以下
試験食群	10以下	10以下	3.20E+03	10以下
(非加熱食群)	10以下	4.80E+08	2.20E+02	8.80E+05
II期				
プラセボ食群	10以下	10以下	1.50E+02	10以下
試験食群	10以下	10以下	3.20E+03	10以下
(非加熱食群)	10以下	1.20E+09	2.20E+03	7.10E+05
III期				
プラセボ食群	10以下	10以下	1.40E+02	10以下
試験食群	10以下	10以下	3.20E+03	10以下
(非加熱食群)	10以下	1.50E+09	2.50E+02	3.30E+06
IV期				
プラセボ食群	10以下	10以下	2.90E+03	10以下
試験食群	10以下	10以下	1.40E+03	10以下
(非加熱食群)	10以下	8.50E+08	1.40E+02	4.60E+06
V期				
プラセボ食群	10以下	10以下	4.20E+02	100以下
試験食群	10以下	10以下	1.80E+02	100以下
(非加熱食群)	10以下	3.70E+09	6.20E+02	1.40E+06
VI期				
プラセボ食群	10以下	10以下	2.80E+02	100以下
試験食群	10以下	10以下	5.20E+02	100以下
(非加熱食群)	10以下	4.80E+09	6.20E+02	5.40E+05



しかし、非便秘群においては、摂取前はすっきりするというものが多かったが、摂取後はすっきり感を感じるものが減少していた。摂取している間は、試験食を毎日摂取することを除いて、それまでの食生活、運動などの日常生活を変えることの無いよう指示していたため、摂取以外の原因でこのような変化が起きたとは考えにくく、原因は明らかでない。

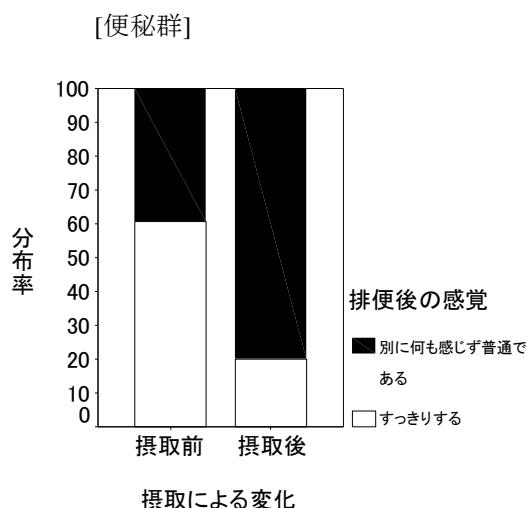


(マン・ホイットニの U 検定  $p < 0.01$ )

図2 摂食による便の形状の変化

### 3-6 便秘の症状

便秘は、排便に苦痛を感じるあるいは、排便後に残便感を感じるものが特徴である。図3は、摂取による排便後の感覚の変化を表したものである。便秘群において、摂取前は排便後に残便感を感じるものが多かったが、摂取後は減少し、すっきりはしないものの、何も感じないものが有意に増加した( $P < 0.01$ )。GABA含有漬物の摂食により、若干の排便日数の増加、便の形状の改善、排便後の感覚の改善が見られ、総体的に緩やかな便秘



(マン・ホイットニの U 検定  $p < 0.01$ )

図3 摂食による排便後の感覚の変化

#### 4. 考察

便秘は個人的な習性として、種々の複雑な原因で発生するため適切な対処治療法がないとされる<sup>1)</sup>。しかし若年女性が GABA 含有漬物を毎日摂取することにより、腸内環境の改善に一定の効果がみられ、継続摂取することが便秘の解消に役立つことがわかった(図 3)。健康栄養補助食品を謳った飲料、サプリメントなどが市販され、大豆由来のオリゴ糖を高齢者に摂取させ便通に及ぼす影響を調べた研究報告があるが<sup>13-15)</sup>、これらは一種のサプリメントと考えられ漬物のように日常摂取できる食品ではないと考えられる。漬物は 100g あたりのエネルギーが 40-50 kcal と少なく、ミネラル、各種ビタミン類を無理なく摂取できる理想的な食品である<sup>12)</sup>。さらに腸内ぜん動運動を促進する不溶性食物繊維が 2% 含まれるため、便秘改善に優れた健康食品とされる<sup>7)</sup>。

食後の正常な代謝活動結果としての糞便はヒト大腸内の環境を反映しており、糞便内のフローラは生活習慣、食事成分の違いを提示する。日本人の食生活が伝統的な和食摂取から高脂肪食摂取に変わった場合、糞便中のビフィズス菌比率が激減し、バクテロイデス群が有意に増加する報告がある<sup>7)</sup>。高コレステロール食摂取を継続すると、腸内フローラ内のウエルシュ菌が増加し、同時に糞便内の  $\beta$ -グルクロニダーゼ、ニトロレダクターゼ活性が増加していた<sup>6)</sup>。糞便内  $\beta$ -グルクロニダーゼは腸内で細菌が産生する  $\beta$ -グルクロニダーゼとほぼ同一であり、大腸菌のみにみられる特異的な酵素として大腸菌の 95% が保持している<sup>28)</sup>。ウエルシュ菌などの有害菌は、これと拮抗する腸内フローラ(ビフィズス菌等)による腸上皮恒常性の維持を

阻害し、有用な代謝物の共役反応から良性腸内フローラを脱離させる方向に働くものと考えられる<sup>28)</sup>。これらの脱離は *Lactobacillus* 属細菌を経口投与することで抑制できることが報告されている<sup>29,30)</sup>。このようなプロバイオテイクスによる病原菌増殖抑制は、①病原菌の腸管上皮細胞への定着を阻害すること<sup>31,32)</sup>、②病原菌  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性を抑制すること<sup>33)</sup>、さらに③有益な  $\beta$ -ガラクトシダーゼを亢進すること<sup>33)</sup>で発現される。一方乳酸菌が産生する種々の生理活性物質(バクテリオシン)が有する強い殺菌活性および有機酸産生による環境内 pH の低下が有害菌の増殖抑制に有効であることが報告されている<sup>34,35)</sup>。最近 Kim らは *L. brevis* 由来  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を大腸菌で発現させ、フラボノイド配糖体 baicalin の活用に関与する研究を行っている<sup>10)</sup>。

食品の品質保全を目的として、しばしば食品製造現場で実施される 60-80°C の低温加熱殺菌では、グラム陰性の有害菌はほぼ死滅するが、病原性でない一般細菌とくに乳酸菌が増殖できる環境になる<sup>27)</sup>。乳酸菌は一般生菌測定用培地上でも増殖するので、試験食で一般生菌/乳酸菌としてカウントされた菌数は、白菜原料に添加し培養して生じた *L. brevis subsp. coagulans* の寄与によるものであると考えられる(表 3、4)。包装単位供与後、GABA 含有量、微生物フローラとその菌数は、全スケジュール(I - VI 期)を通して統計学的に大幅な差異は生じなかった。GABA による便秘改善以外の健康増進保護効果として、健康成人に *L. brevis* 生菌を摂取させたところ  $\alpha$ -インターフェロンの顕著な上昇がみられたが、加熱処理した死菌では効果がなかったという報告がある<sup>36)</sup>。



ShimadaらはGABA含有クロレラの摂取により、高血圧症患者の血圧影響に効果を認めた<sup>37)</sup>。試験食中の生菌/死菌を含む微生物投与後の生理学的効果については別途研究が進行中である。

腸内フローラの構成は宿主の食餌形態によって変動するが、食事成分の構成、食習慣、年齢などの問題があるため、いまだに研究者間で一致した結論は得られていない。現在集積されている研究結果から引き出される共通のコンセプトは、ヒト腸内フローラは極端な食餌の変化がない限り劇的に変化しにくいということである<sup>46)</sup>。

本研究の結果はGABAのような乳酸菌代謝物が便秘改善に寄与している可能性を示している。我々は京都の伝統食品である「しば漬け」からGABA生産性乳酸菌を取得し、暫定的に*Lactobacillus kefir*と同定した<sup>26)</sup>。当該菌株については現在、16S rRNA解析<sup>38)</sup>による詳細な見直しが進んでいる<sup>39)</sup>。

## 5. 謝辞

GABA含有漬物を製造していただいた株式会社西利 平井啓理、落合春菜、谷口久美子、森勝史の各氏に深甚の意を表す。本研究の一部は2008年度日本食品化学研究財団研究助成金により行なわれた。

## 6. 引用文献

1. <http://www.kenkounippon21.gr.jp/kenkounippon21/about/tsuuchibun/-1.html>
2. Mitsuoka T. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *19*(1): 15-25 (2000)
3. Lidbeck A, Nord CE. *Lactobacilli* and the normal human anaerobic microflora. *Clin Infect Dis.* **16** Suppl 4:S181-7 (1993).
4. Vaughan, E.E., Heliq H.G., Ben-Amor, K., de Vos W.M. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev.* **29**(3):477-490 (2005).
5. Moore, W.E.C. The effect of diet on the human fecal flora. In: Bruce, W.R. et al. (eds.) *Banbury report & Gastrointestinal Cancer: endogenous factors*, p.11-24, Gold Spring Harbor Laboratory, USA (1981).
6. 遠藤希三子 動物性脂肪および食物繊維の腸内フローラならびに宿主の代謝に及ぼす影響. p31-51, 光岡知足(編), 腸内フローラと生体ホメオスタシス, 学会出版センター, 東京 (1989)
7. Benno, Y. Suzuki K, Suzuki K, Narisawa K, Bruce WR, Mitsuoka T. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol. Immunol.*, **30**: 521-531 (1986)
8. K. Wrenn. Fecal impaction. *N Engl J Med* **321**: 658-662 (1989)
9. Wright, B.A. and Staats D.O. The geriatric implications of fecal impaction. *Nurse Pract.* **11**: 53-58 (1986).
10. Kim HS, Kim JY, Park MS, Zheng H, Ji GE. Cloning and expression of beta-glucuronidase from *Lactobacillus brevis* in *E. coli* and application in the bioconversion of baicalin and wogonoside. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**(12): 1650-1655 (2009).
11. Goldining B.R., wenson, L., Dwyer J., Sexton M. Gorbach S.L. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements human bacterial enzymes. *J Natl Cancer Inst* **64**(1):235-260 (1980).
12. 食品成分表—新しい「日本食品標準成分表 2010」による 香川芳子編 女子栄養大学出版部(2010).
13. 和田光一、渡部侑子、水谷潤、鈴木宏美、桐生直美、早川邦彦、山口智恵子 大豆由来オリゴ糖摂取の老人の腸内フローラおよび便性に及ぼす影響 ビフィズス **4**(2):135-141 (1991)
14. 梶本修身、大木浩司、逸見将、森本ふみか、佐野淳、吉村千秋、渡部侑子、

- 鈴木宏美、金子京子、高橋励 新規大豆オリゴ糖含有飲料が便秘傾向の対象者の糞便内細菌叢および便通に与える影響. 新薬と臨床 **49**(7):656-665 (2000)
15. 木村雅行、長南治、高橋理恵、大橋あけみ、新井ゆみ、早川和仁、笠羽恵子、石原千代子  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)含有はっ酵乳製品の健常成人に対する影響  
日本食品化学学会誌 **9**: 1-6 (2002)
16. Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase.  
*J Mol Cat B; Enzymatic* **10**: 67-79 (2000)
17. Watanabe Y., Hayakawa K. and Hiroshi Ueno H. Effects of co-culturing LAB on GABA production. *J. Biol Macromol* **11**(1): 3-13 (2011).
18. 早川潔、上野義栄、河村真也、谷口良三、小田耕平 乳酸菌による $\gamma$ -アミノ酪酸の生産 生物工学会誌 **75**: 239-244 (1997)
19. Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S. and Oda, K. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12004. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**:1168-1171 (1997).
20. Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., Kobayashi, Kimoto, H., Suzuki, I., and Aso, H. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology* **145**: 1375-1380 (1999).
21. Park, K. and Oh, S.H. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Sci. Nutr.* **9**:324-329 (2004).
22. Cho, Y.R., Chang, J.Y., and Chang, H.C. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimuchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 104-109 (2007).
23. 食品微生物検査マニュアル(森地敏樹監修 新版)p257-300 日水 (2005)
24. 臨床微生物検査ハンドブック 第3版  
小栗豊子編集 三輪書店 (2008)
25. Gutmann, I. & Wahlefeld, A.W (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3. pp. 1464-1468; Verlag Chemic, Weinheim/Academic Press Inc., New York and London
26. 平井啓理、落合春菜、森勝史、瀧井幸男 しば漬由来 $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)産生乳酸菌の単離とその特性 食品・臨床栄養 **1**: 49-52 (2006)
27. 日本食品保全研究会編 食品微生物制御技術の進歩 p60-70 中央法規出版(1998)
28. Gaskins HR. Immunological aspects of host/microbiota interactions at the intestinal epithelium. In Mackie R. I., White B. A., and Isaacson R. E. (eds.). *Gastrointestinal microbiology*. New York: International Thomson Publishing (1997).
29. W. H. Ling, H. Mykkaenen, O. Haenninen, R. Korpelar, S. Salminen. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J. Nutr* **124**(1):18-23 (1994)
30. Marts Mroczynska and Zdzislaw Libudzisz.  $\beta$ -Glucuronidase and  $\beta$ -glucosidase activity of *Lactobacillus* and *Enterococcus* isolated from human feces. *Polish Journal of Microbiology*. **59**(4):265-269 (2010)
31. Stavric S, Gleeson TM, Blanchfield B et al. Role of adhering microflora in competitive exclusion of *Salmonella* from young chicks. *J Food Protect* **50**:928-932 (1987)
32. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Kamiya S. Studies of the effect of *Clostridium butyricum* on *Helicobacter pylori* in several test models including gnotobiotic mice. *J Med Microbiol* **49**:635-642 (2000)
33. Goldin BR, Gorbach SL: The effect of milk and *lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr* **39**:756-761 (1984)
34. Marteau P, Vesa T. Pharmacokinetics of

- probiotics and biotherapeutic agents in humans. *Biosci Microflora* 17:1-6 (1998)
35. Borriello SP: The application of bacterial antagonism in the prevention and treatment of *Clostridium difficile* infection of the gut. In: Anaerobes Today (Hardie JM and Borriello SP eds.) pp195-202, John Willey & Sons Ltd., Chichester, (1988).
36. Kishi A., Uno K., Matsubara Y., Okuda C. and Kishida T. Effect of the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* on interferon-alpha producing capacity in humans. *J. Am. Coll. Nutr.* **15**:408-412 (1966).
37. Shimada M., Hasegawa T., Nishimura C., Kan H., Kanno T., Nakamura T. and Matsubara T. Anti-hypertensive effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) -rich Chlorera on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clin Exp Hypertens.* **31**: 342-354 (2009).
38. Mori K, Yamazaki K, Ishiyama T, Katsumata M, Kobayashi K, Kawai Y, Inoue N, Shinano H. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int J Syst Bacteriol.* Jan;**47**(1) 54-57 (1997)
39. Yukio Takii et al. Identification of *Lactobacillus* sp. isolated from the pickled vegetables with *Lactobacillus buchneri* (submitted for publication)

**Improvement of constipation and fecal impaction for female students by daily taking in the pickled vegetables fermented with *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* containing gamma-aminobutyric acid**

Syumi Yamamoto<sup>1</sup>, Sayaka Nishimura, Yuka Kobayashi and Yukio Takii<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, School of Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, 6-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo663-8558

<sup>2</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Bioenvironmental Science, Kyoto Gakuen University, 1-1 Nanjo Otani, Sogabe-cho, Kameoka, Kyoto621-8555

Key words: gamma-aminobutyric acid (GABA), constipation, pickles, *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) subsp. *coagulans*

**Abstract**

Non-invasive treatments for constipation of healthy subjects (56 female university students: 18.3 average years of age) were conducted by daily taking in the pickled vegetables for 2 weeks. The subjects were divided equally in two groups for taking pickles containing gamma-aminobutyric acid after fermented with *Lactobacillus brevis* or non-fermented pickles as placebo. Not great differences in blood fatty acids were observed between two groups. However, the groups fed with fermented pickles had not atypical presentation of fecal impactions and frustrating fecal incontinence was attenuated.

(責任編集委員：尾関健二)