

# 乳児期における腸内細菌叢の形成と その乱れ

関西医科大学医学部 小児科学講座

あかがわしょうへい あかがわ ゆ う こ つじ しょうじ かね こかずなり  
赤川翔平, 赤川友布子, 辻 章志, 金子一成



Shohei Akagawa

## はじめに

腸内細菌叢とはヒトの腸管内で一定のバランスを保ちながら共存している多種多様な細菌集団である。近年、次世代シーケンサーなどによる遺伝子解析技術が進み、腸内細菌叢を構成する細菌の種類や機能を詳細に分析できるようになった。その結果、ヒトの健康維持における腸内細菌叢の重要性がこれまでも増して認識されている。

本稿では腸内細菌叢に関する基本的事項と、腸内細菌叢に影響を及ぼす因子、正常な腸内細菌叢の維持や回復を目的とした介入法について、近年の報告や自験例を中心に紹介する。

## I. 腸内細菌叢とは？

100年以上前から分離培養法（糞便を培地に塗布し培養して分離する方法）を用いて腸内細菌についての研究が行われていたが、この方法では検出できる菌種に限界があった。しかし、21世紀に入って次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析法が普及し、細菌に特異的な16S リボソームRNA 遺伝子を用いた解析を行うことが可能になったため、これまで培養が困難であった細菌も検出可能となり、ヒトの腸内細菌叢に関する知見が急速に深まった。具体的には、ヒトの体を構成する細胞数は約60兆個程度と考えられているが、体内にはヒトの体を構成する細胞数を上回る100兆個以上、種類にして1,000種類以上の細菌が存在する（重さにすると1～2 kg）<sup>1)</sup>。また細菌はヒトの皮膚、消化管、呼吸器系、口腔、膣などに常在しているが、その90%以上は消化管に生息している。そして腸内細菌は脂質やタンパク質だけでなく、ヒトが消化することのできない難消化性

物質の代謝を行い、短鎖脂肪酸（酢酸、酪酸、プロピオン酸、乳酸、コハク酸）などを産生することで大腸粘膜上皮にエネルギーを供給し、感染防御や発がん抑制に関与し、あたかも一つの臓器として機能している。

細菌は系統的に界 (kingdom), 門 (phylum), 綱 (class), 目 (order), 科 (family), 属 (genus), 種 (species) に分類される。本稿では主に「目」や「属」レベルで細菌を分類し表記する。

## II. 腸内細菌叢の発達と疾患との関連

ヒトのライフステージにおける腸内細菌叢の変化については、光岡らが分離培養法を用いて1974年に最初に報告している<sup>2)</sup>。それによれば、生後1カ月までに Acinetobacteria 門の *Bifidobacterium* 属（ビフィズス菌）が増殖し、離乳期以降は Bacteroidetes 門の *Bacteroides* 属や Firmicutes 門の *Clostridium* 属, *Eubacterium* 属が増殖し、Bacteroides 門と Firmicutes 門を中心とした成人期の腸内細菌叢へ変化する<sup>2)</sup>。

一方、胎児期の腸内細菌叢について、かつては無菌であると考えられていたが、近年の研究では胎盤<sup>3)</sup>や羊水<sup>4)</sup>、帝王切開で出生した児の胎便<sup>5)</sup>からも細菌 DNA が検出されており、腸内細菌叢の形成は胎児期から始まっていると考えられている<sup>3)~5)</sup>。この胎児期の腸内細菌叢の形成メカニズムについては不明な点も多いが、母体の腸内細菌叢そのものが胎盤を通じて胎児の腸内細菌叢を形成しているというプログラミング仮説も提唱されている<sup>6)</sup>。

そして出生直後から母体の産道や皮膚の細菌叢および環境中の細菌に曝露されながら、児の腸内細菌叢は劇的に変化し3歳ころまでに成人と同様

となる<sup>2)</sup>。

腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) は様々な疾患の発症に関与することが明らかになってきている。具体的には炎症性腸疾患<sup>7)8)</sup>、過敏性腸症候群<sup>9)</sup>、壊死性腸炎<sup>10)</sup>などの消化管疾患を始めとして、アレルギー関連疾患<sup>11)12)</sup>、肥満やメタボリックシンドローム<sup>13)14)</sup>、糖尿病<sup>15)</sup>、自己免疫疾患<sup>16)</sup>、自閉症スペクトラム<sup>17)</sup>、乳幼児突然死症候群<sup>18)</sup>などの発症にも関与している可能性が示唆されている。

### III. 腸内細菌叢に影響を与える因子

前述のように、新生児期および乳幼児期の腸内細菌叢は劇的に変化し<sup>2)</sup>、3歳ころに成人と同様の腸内細菌叢が形成されることが知られているが、この時期の腸内細菌叢の dysbiosis は成人期にまでトラッキングすると考えられている<sup>19)</sup>。したがって、この時期の腸内細菌叢をよりよい状況に保つことはきわめて重要である<sup>20)</sup>。新生児から乳幼児期にかけての腸内細菌叢に影響を与える因子として、母体の膣の常在菌や腸管内の細菌叢<sup>21)22)</sup>、分娩様式<sup>23)~25)</sup>、栄養方法<sup>23)~25)</sup>、抗菌薬の使用<sup>25)26)</sup>、在胎週数<sup>27)</sup>、同胞やペット飼育の有無<sup>28)</sup>、衛生状況を含めた地域差<sup>29)</sup>などが挙げられる。筆者らは最近、分娩様式、栄養方法、および抗菌薬の投与が新生児や乳児の腸内細菌叢に与える影響について検討したので以下に簡単に紹介する。

#### 1. 分娩様式、栄養方法と腸内細菌叢

新生児は経膣分娩により母体の産道を通る際に母体の膣や腸管内に常在する有益菌である Bifidobacteriales 目 (ビフィズス菌) や Bacteroidales 目 (バクテロイデス菌) を獲得する。一方、産道を通りせずに出生する帝王切開分娩では、それらの菌を獲得する機会を逃し dysbiosis を来すと報告されている<sup>30)</sup>。また母乳には Bifidobacteriales 目が含まれるほか、プレバイオティクスとして知られるオリゴ糖が含まれている。プレバイオティクスは、消化管上部で分解・吸収されず、大腸に共生する有益な細菌の選択的な栄養源となり、それらの増殖を促進するもので、結果として正常な腸内細菌叢の維持や dysbiosis の是正に有用な食品成分を指す。オリゴ糖 (ガラクトオリゴ糖, フラクトオリゴ糖, 大豆オリゴ糖, 乳果オリゴ糖, キシロオリゴ糖, イソマルオリゴ

糖, ラフィノース, ラクチュロース, コーヒー豆マンノオリゴ糖, グルコン酸など) のほかには食物繊維の一部 (ポリデキストロース, イヌリンなど) が挙げられる。

筆者らは帝王切開で出生した日本人新生児においても腸内細菌叢は dysbiosis を来しているのか、そしてもし dysbiosis が存在するならば、母乳栄養によりそれを是正することができるのか否かを明らかにすることを目的に検討を行った<sup>31)</sup>。対象は2015年9月から2016年8月に同一施設 (大阪府内の市立病院・産婦人科) で出生した両親が日本人の正産、正常体重の新生児36例とし、産婦人科退院前の日齢4と1カ月健診受診時に糞便検体を採取し-80℃で凍結保存した。そしてその凍結検体を解凍後、細菌 DNA を抽出し、PCR で増幅のうえ、Ion PGM System (Thermo fisher scientific 社) を用いてメタ16S リボソーム RNA 解析によって腸内細菌叢の評価を行った。腸内細菌叢の評価法としては、微生物生態系の生物学的多様性を示す Shannon Index と腸内細菌叢の構成割合を菌目レベルで比較した。検討にあたってはまず、分娩様式 (経膣分娩または帝王切開) による腸内細菌叢への影響を検討する目的で、経膣分娩で出生した新生児と帝王切開で出生した新生児の生後4日目の便の解析結果を比較した。次に生後1カ月間の栄養方法 (母乳栄養または人工乳栄養) が腸内細菌叢に及ぼす影響を検討する目的で、対象を4群に分け、生後1カ月時点で採取した便の解析を行った。4群の内訳と対象人数は、経膣分娩で出生し1カ月間、母乳栄養で育てられた新生児 (経膣分娩/母乳栄養群) が10例、経膣分娩で出生し1カ月間、人工乳栄養で育てられた新生児 (経膣分娩/人工乳栄養群) が10例、帝王切開分娩で出生し1カ月間、母乳栄養で育てられた新生児 (帝王切開/母乳栄養群) が10例、帝王切開分娩で出生し1カ月間、人工乳栄養で育てられた新生児 (帝王切開/人工乳栄養群) が6例であった。4群間で性別、出生体重、在胎週数に有意差は認めず、また人工乳栄養群には完全人工乳栄養 (一度も母乳を摂取したことがない) の新生児はいなかった。なお栄養方法については、日本小児科学会の推奨にしたがって「1カ月時までの総哺乳量の8割以上が母乳」の場合を母乳栄養、「8割以上が人工乳」の場合を人工乳栄養と定義した<sup>32)</sup>。

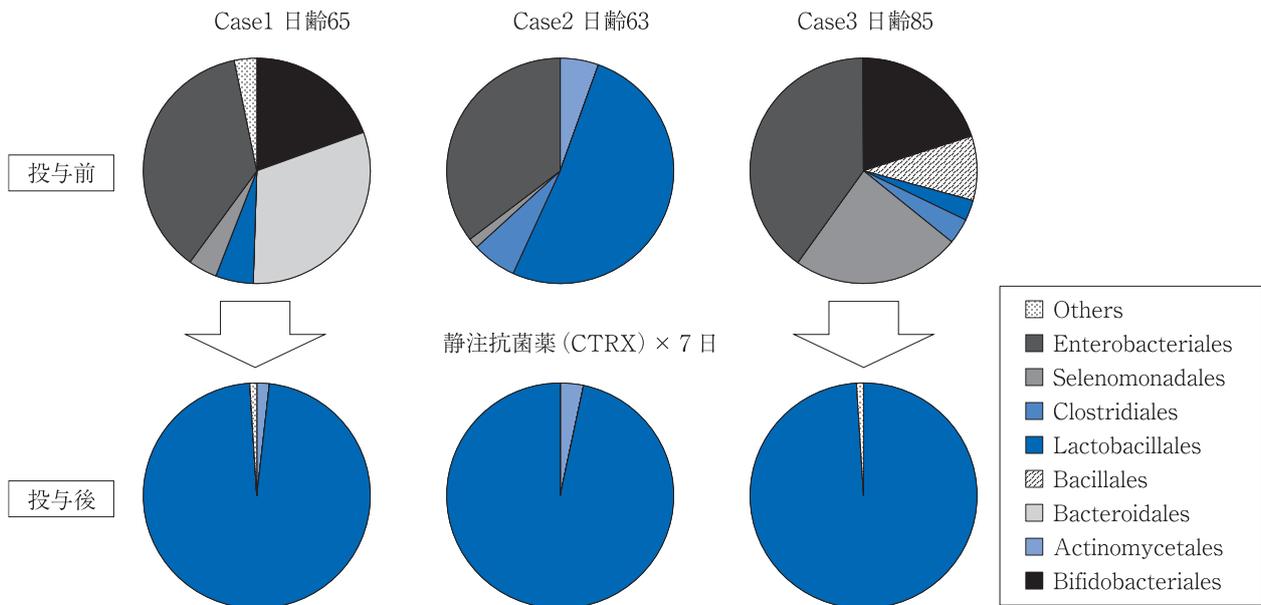


図 抗菌薬投与前後での腸内細菌叢の比較

上部尿路感染症の乳児3例に対し、静注用抗菌薬（CTRX）を7日間投与したところ、腸内細菌叢はほぼLactobacillales目1種類となった。

その結果、まず日齢4において経膈分娩児（ $n=20$ ）は、帝王切開児（ $n=16$ ）と比較して有意にLactobacillales目、Bacillales目の割合が低く、Enterobacteriales目、Bacteroides目の割合が高かった。また経膈分娩児ではShannon Indexの中央値が2.20であったのに対し、帝王切開児では中央値1.79と有意に低かった（ $p=0.04$ ）。一方、生後1カ月時には4群間でShannon Indexに差は認めなかった（経膈分娩/母乳栄養群 2.00 [中央値，以下同様]，経膈分娩/人工乳栄養群 2.37，帝王切開/母乳栄養群 2.26，帝王切開/人工乳栄養群 2.12）。また菌目の構成割合はBacteroides目において4群間で有意な差を認めたが、ほかの菌目については有意な差は認めなかった。

以上の結果から、分娩様式の影響が大きい日齢4では、経膈分娩児に比して帝王切開児は、膈や腸管の常在菌であるLactobacillales目やBacillales目が少なく、多様性も低く、腸内細菌叢のdysbiosisが明らかであるものの、生後1カ月時点では分娩方法や栄養方法の違いによる腸内細菌叢の差異は小さくなっていることが明らかとなった。生後1カ月時点で4群の腸内細菌叢が類似した理由としては本研究において人工乳栄養とした新生児も全例、多少の母乳を乳房から摂取していたことが関与していると思われる。すなわち、少量であっても乳房から母乳を摂取することにより

帝王切開で出生した児のdysbiosisが是正できる可能性が示唆された。

## 2. 抗菌薬投与と腸内細菌叢

抗菌薬は病原菌だけでなく腸管内の有益菌も排除してしまうためにdysbiosisを来し、副作用として下痢を起こすことはよく知られている。しかし抗菌薬が乳児の腸内細菌叢に及ぼす影響について詳細な検討は少ない。そこで筆者らは抗菌薬投与による腸内細菌叢の変化について検討する目的で、上部尿路感染症で入院した生後3カ月未満の乳児3例において、抗菌薬治療開始前と静注用抗菌薬（ceftriaxone）を7日間投与後に糞便を採取し、メタ16SリボソームRNA解析を行った<sup>33)</sup>。その結果、図に示すように、3症例とも抗菌薬投与前には腸内細菌叢の多様性が認められた（Shannon Index 2.7-3.0：最小値-最大値）ものの、投与中は多様性が有意に低下し（Shannon Index 0.1-1.1：最小値-最大値， $p=0.04$ ），腸内細菌がほぼLactobacillales目のみとなっていた。この理由としてこの時期の腸内細菌叢を構成する細菌のうち、Lactobacillales目に含まれる*Enterococcus faecium*や*Enterococcus avium*がceftriaxoneの抗菌スペクトラムに含まれていなかったためと考えられた。以上のことから、乳児においては短期間の抗菌薬投与でも強いdysbiosisを招く可能性が示唆された。

## IV. 腸内細菌叢の是正を目的とした治療

腸内細菌叢と様々な疾患の関連が明らかになるにつれ、腸内細菌叢を改善させることによる疾患の予防法や治療を確立することが求められている。現在行われている腸内細菌叢の dysbiosis への介入策をいくつか紹介する。

### 1. プロバイオティクス, プレバイオティクスやバイオジェニックスの投与

プロバイオティクスは、腸内微生物のバランスを改善することで宿主に有益に働く生菌添加物のことで、乳酸菌などを含むヨーグルトや乳製品、そのほかの発酵食品など古くから親しまれてきたものに加えて、様々な菌を含む製剤が多く開発されている。一方、プレバイオティクスは、腸内の有用菌の増殖を促進し、活性を高めることで宿主の健康に寄与する難消化性食品成分と定義される。具体的にはオリゴ糖、食物繊維、難消化性炭水化物などが挙げられる。またプロバイオティクスとプレバイオティクスを合わせたシンバイオティクスという概念も提唱されている。さらに近年は、腸内細菌叢を介することなく、直接、生体機能調節・生体防御・疾病予防・回復・老化制御に働く食品成分（各種生理活性ペプチド、植物ポリフェノール、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、ビタミンなど）をバイオジェニックスと呼ぶこともある<sup>34)</sup>。プロバイオティクス、プレバイオティクスやバイオジェニックスの摂取が実際に、ヒトの健康増進に有用か否かについてはまだ十分なエビデンスがあるとは言えない<sup>35)</sup>。

### 2. 糞移植

健康な人の糞便を患者に移植することによって、正常な腸内細菌叢に近づけ疾患を治療する方法である。現在までに成人でクロストリジウム感染症<sup>36)</sup>、潰瘍性大腸炎<sup>37)</sup>、抵抗性の機能性消化管疾患<sup>38)</sup>に対して有用であったとの報告がされている。一般的な投与法は、溶解した健常ドナーの糞便を上部消化管内視鏡を用いて経十二指腸的に投与する方法や、下部消化管内視鏡や注腸によって経大腸的に投与する方法が行われている。

### 3. 疑似経膣分娩

前述したように、帝王切開分娩では産道を通過しないため、産道に存在する有益菌を獲得できず、母体の皮膚常在菌を中心に腸内細菌叢が形成

される。そこで、帝王切開分娩で出生した新生児に対して母体の膣内に留置しておいたガーゼで拭うことによって、母体の膣内細菌を獲得させようという疑似経膣分娩の試みも報告されている。この報告によれば、疑似経膣分娩を行った帝王切開分娩児の生後1カ月時の腸内細菌叢は、経膣分娩で出生した新生児に近いものになっていたとしている<sup>39)</sup>。

## おわりに

細菌の検出法の飛躍的發展に伴い、人体における腸内細菌叢の様々な働きや疾患との関連が明らかになっている。現在、小児においても様々な疾患に対してプロバイオティクスなどを用いた腸内細菌叢の dysbiosis の予防や是正による治療効果が検討されており<sup>40)~42)</sup>、その成果が待たれる。

## 文 献

- 1) Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, et al.: The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* 2015; 26: 26050.
- 2) Mitsuoka T, Hayakawa K, Kimura N: [The faecal flora of man. II. The composition of bifidobacterium flora of different age groups (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 1974; 226: 469-478.
- 3) Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al.: The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014; 6: 237ra65.
- 4) DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, et al.: Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 2008; 3: e3056.
- 5) Jimenez E, Marin ML, Martin R, et al.: Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 2008; 159: 187-193.
- 6) Gomez de Agüero M, Ganal-Vonarburg SC, Fuhrer T, et al.: The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* 2016; 351: 1296-1302.
- 7) Bellaguarda E, Chang EB: IBD and the gut microbiota—from bench to personalized medicine. *Curr Gastroenterol Rep* 2015; 17: 15.
- 8) Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al.: The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 2014; 15: 382-392.
- 9) Simren M: IBS with intestinal microbial dysbiosis: a new and clinically relevant subgroup? *Gut* 2014; 63: 1685-1686.
- 10) Torrazza RM, Ukhanova M, Wang X, et al.: Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. *PLoS One* 2013; 8: e83304.
- 11) Subbarao P, Anand SS, Becker AB, et al.: The Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) Study: examining developmental origins

- of allergy and asthma. *Thorax* 2015 ; 70 : 998-1000.
- 12) Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. : Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011 ; 331 : 337-341.
  - 13) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. : An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006 ; 444 : 1027-1031.
  - 14) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. : A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009 ; 457 : 480-484.
  - 15) Tilg H, Kaser A : Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 2126-2132.
  - 16) Van Praet JT, Donovan E, Vanassche I, et al. : Commensal microbiota influence systemic autoimmune responses. *EMBO J* 2015 ; 34 : 466-474.
  - 17) Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. : Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 2013 ; 155 : 1451-1463.
  - 18) Goldwater PN : Gut Microbiota and Immunity : Possible Role in Sudden Infant Death Syndrome. *Front Immunol* 2015 ; 6 : 269.
  - 19) Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. : Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012 ; 486 : 222-227.
  - 20) Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, et al. : Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007 ; 5 : e177.
  - 21) Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, et al. : Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLoS One* 2013 ; 8 : e78331.
  - 22) Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, et al. : The infant microbiome development : mom matters. *Trends Mol Med* 2015 ; 21 : 109-117.
  - 23) Azad MB, Konya T, Maughan H, et al. : Gut microbiota of healthy Canadian infants : profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ* 2013 ; 185 : 385-394.
  - 24) Backhed F, Roswall J, Peng Y, et al. : Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 2015 ; 17 : 852.
  - 25) Penders J, Thijs C, Vink C, et al. : Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006 ; 118 : 511-521.
  - 26) Greenwood C, Morrow AL, Lagomarcino AJ, et al. : Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of *Enterobacter*. *J Pediatr* 2014 ; 165 : 23-29.
  - 27) Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, et al. : Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 2011 ; 158 : 390-396.
  - 28) Azad MB, Konya T, Maughan H, et al. : Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease : impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2013 ; 9 : 15.
  - 29) De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al. : Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; 107 : 14691-14696.
  - 30) Koleva PT, Kim JS, Scott JA, et al. : Microbial programming of health and disease starts during fetal life. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2015 ; 105 : 265-277.
  - 31) 赤川翔平, 駿田竹紫, 山口 正, 他 : 分娩様式と栄養方法が新生児の腸内細菌叢に及ぼす影響 メタゲノム解析による検討. *日本小児科学会雑誌* 2018 ; 122 : 297.
  - 32) 清水俊明 : 小児科医と母乳育児推進 母乳育児の定義. *日本小児科学会雑誌* 2011 ; 115 : 1364-1367.
  - 33) 赤川翔平, 赤川友布子, 大沼竹紫, 他 : 乳児に対する抗菌薬投与前後の腸内細菌叢の経時的変化 次世代シーケンサーを用いたメタ16S リボソーム RNA 解析. *日本小児泌尿器科学会雑誌* 2018 ; 27 : 205.
  - 34) Mitsuoka T : Significance of Dietary Modulation of Intestinal Flora and Intestinal Environment. *Biosci Microflora* 2000 ; 19 : 15-25.
  - 35) Lee YY, Hassan SA, Ismail IH, et al. : Gut microbiota in early life and its influence on health and disease : A position paper by the Malaysian Working Group on Gastrointestinal Health. *J Paediatr Child Health* 2017 ; 53 : 1152-1158.
  - 36) van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. : Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013 ; 368 : 407-415.
  - 37) Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, et al. : Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 2015 ; 149 : 102-9 e6.
  - 38) Pinn DM, Aroniadis OC, Brandt LJ : Is fecal microbiota transplantation the answer for irritable bowel syndrome? A single-center experience. *Am J Gastroenterol* 2014 ; 109 : 1831-1832.
  - 39) Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, et al. : Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med* 2016 ; 22 : 250-253.
  - 40) Osborn DA, Sinn JK : Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 ; CD006475.
  - 41) Panigrahi P, Parida S, Nanda NC, et al. : A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. *Nature* 2017 ; 548 : 407-412.
  - 42) Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, et al. : Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2017 ; 12 : CD006095.