

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461586

研究課題名(和文) 新生児の腸内フローラの形成が成長発達に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Study of the newborn gut microbiome affect growth and development of the infants.

研究代表者

田内 久道 (Tauchi, Hisamichi)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30314959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は分子生物学的手法を用いて、新生児の腸内細菌は無菌の状態から腸内細菌科細菌が優勢な時期を経て生後1ヶ月の時点でビフィズス菌が優位となることを明らかにした。また新生児集中治療室(NICU)で治療されている新生児では腸内細菌の獲得過程が正常新生児とは全く異なり、ビフィズス菌の獲得も著しく遅延していることも明らかとした。このことがNICUで治療される新生児の感染防御や成長・発達に影響している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Gut microbe colonisation begins immediately after birth, and bacterial ecosystems develop within the first few days. Previous studies have reported that the compositions of infant gut microbiota differ from those of adult, that substitution occurs between individuals, and that bifidobacterial predominate in most infant. Furthermore, it has been demonstrated that gut microbiota developed during infancy can have long-lasting effects on the individual's future health. However, little is known about their regularity, factors that drive the assembly of infant microbiota, and how these factors affect metabolite profiles. We investigated gut microbiota composition and metabolic profiles using 270 stool samples obtained from 17 preterm infants and 43 healthy infants. We revealed that enterobacterial acquisition process of newborn baby treated in a neonatal intensive care unit (NICU) was different from the normal newborn baby, and the acquisition of the Bifidobacterium was remarkably delay.

研究分野：小児科学

キーワード：腸内細菌叢 新生児 NICU

1. 研究開始当初の背景

ヒトが生きていくためには腸内細菌叢は無くしてはならない存在であり、新生児の正常な発育発達には以下のように腸内細菌が密接に関わっている。

- (1) 母乳中には含まれているオリゴ糖は腸管内の Bifidobacteriaceae により分解されたのち吸収される。
- (2) ビタミン K は腸内細菌により産生され、ヒトの止血機構に関与しているが、新生児期にはその産生が充分でない場合消化管出血や脳出血などの重篤な合併症を引き起こす。
- (3) 腸内細菌によるビタミン B12 の産生が充分でないと貧血が発症する。
- (4) 腸管内の正常細菌叢が十分発達していないと考えられる NICU で治療中の新生児は通常より高率にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が腸管に定着し感染制御上問題となっている (新生児医療における MRSA に関する日本小児科学会新生児委員会の見解 平成 13 年 5 月日本小児科学会新生児委員会)。
- (5) 腸内細菌を定着させない環境で育ったマウスでは腸内細菌叢によって産生が促進される神経伝達物質が発達過程にある脳に働かないため多動障害となる (Heijtz RD et al., PNAS, 2011)

現在新生児の腸内細菌叢の確立に関するデータは主に 2000 年以前に便の培養法によって得られたものである。しかし、便の嫌気性培養を行うと多種多様なコロニーが得られそれを同定し定量するためには高度なテクニックと多くの手間がかかるため、培養法を用いた腸内細菌の同定は再現性に乏しい。また、培養法ではデリケートな嫌気性菌は本来の数より検出数が低くなる傾向がある。このように培養法を用いた腸内細菌の研究には限界があった。

2. 研究の目的

低出生体重児や重篤な疾患を合併して出生した新生児は、生後すぐに NICU 環境下での清潔に管理された保育器内で保育されるため健常新生児とは異なる腸内フローラが形成されている可能性が高い。しかし、この環境下で保育される新生児・乳児の腸内フローラの形成についての詳細は、これまで解析が全く行われていない。

NICU で治療されている新生児は MRSA が容易に腸管に定着する傾向があり、これは腸内フローラが不完全で MRSA が優位菌となりやすいためと考えられている。NICU では腸内細菌叢を早期に獲得させるため、母乳の口腔内塗布や乳酸菌製剤の投与などが経験的に行われているが、これを評価できる科学的根拠はどこにも存在しない。NICU で治療されている新生児の腸内細菌叢形成が健常な新生児と

どのように異なるかを正確に評価することは、MRSA 等の感染予防法の開発につながる有意義な研究であると考えられる。

帝王切開で出生し腸内細菌を定着させない環境で育ったマウスでは腸内細菌叢によって作られる神経伝達物質が発達過程にある脳に働かないため多動障害となることが明らかになった (Heijtz RD, et al., PNAS, 2011)。帝王切開で出生し NICU の環境で治療されている新生児はちょうどこのマウスと同様の環境で保育されていると考えられ、NICU での患児の腸内細菌叢を正確に評価することは患児の神経発達を改善させるために有意義な研究であると考えられる。

3. 研究の方法

新生児の便から DNA を抽出し定量的 PCR、16S rDNA パイロシーケンス解析することにより正確な腸内細菌叢の確立の過程を明らかにする事が可能となった。

- (1) 様々な環境で出生、保育されている新生児の便を多数例評価することにより日本人の腸内細菌叢の獲得についての正常値を確立する。正常新生児の腸内細菌叢の獲得が出産方法 (経膈分娩と帝王切開)、栄養 (母乳と人工栄養または混合栄養)、家族構成 (兄弟の有無)、抗生剤の投与などによりどのように影響を受けているかも明らかにする。
- (2) NICU 環境下で保育される新生児が正常な腸内細菌叢を獲得できるかを、分子生物学的手法を用いた解析法を用いて評価する。さらに、その間の環境変化や投薬をはじめとする医療行為の履歴を調べることによって、環境要因が腸内フローラの形成に与える影響を調べる。また、対象新生児の腸内フローラと精神運動発達についての評価を行う。

4. 研究成果

(1) 健常新生児の腸内細菌の確立

正常新生児 51 例を用いた検討では、無菌の状態で出生した新生児は腸内細菌科細菌が最優勢となる時期を経て、生後 1 ヶ月の時点では 80% でビフィズス菌が最優勢となり以後安定していた (図 1)。

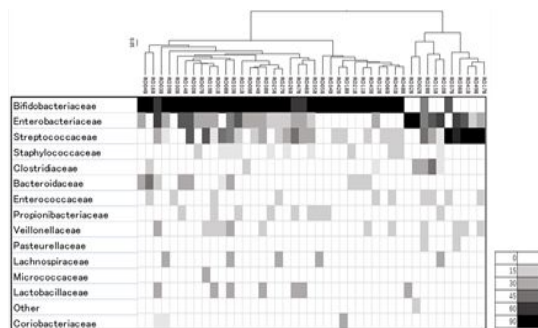


図1 生後1ヶ月時の新生児腸内細菌の構成
80%の例でビフィズス菌が最優勢菌種となっている。

(2) 健常新生児と新生児集中治療室 (NICU) で治療されている新生児の腸内細菌の比較

健常新生児 (左) に比べ NICU 児 (右) では、明らかにピフィズス菌の獲得が遅延していた。また健常新生児が腸内細菌科細菌 (E) が最優勢である時期を経た後ピフィズス菌に移行するのに対して、NICU 児では健常児には見られないレンサ球菌 (Sr)、ブドウ球菌 (St)、腸球菌 (Ec) が優勢である期間が長く見られる (図 2)。

Subjects	Days after birth																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
J	Sh	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
F	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh
G																													
I																													
D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
L	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
A	Sh	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
H	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh
B	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
C	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
K	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

図2 健常新生児とNICU児の出生後腸内細菌最優勢菌種の比較

(3) 保育器での治療期間とピフィズス菌の獲得時期

清潔な保育器に収容されている期間と、ピフィズス菌獲得までの日数には正の相関 (R=0.64) が認められ (図 3)、嚴重な感染対策が NICU 児の正常腸内細菌叢の確立を障害している可能性がある。

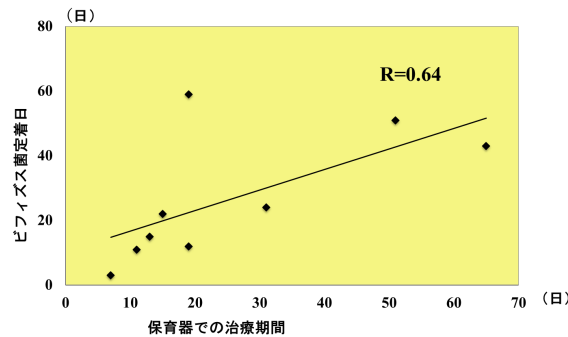


図3 保育器内での治療とピフィズス菌の獲得

以上ように我々は、ヒトの一生で最も劇的に変化する新生児期の腸内細菌の変化について分子生物学的手法を用いて検討を行った。また NICU 環境下で治療されている新生児は清潔に管理された保育器内で保育されるため、健常新生児とは異なる腸内フローラが形成されていることを世界で初めて明らかにした。

NICU で治療されている新生児は、治療中は MRSA を始めとする感染の危険にさらされ、その後も成長および神経学的な発達に関しハイリスクである。ピフィズス菌の投与により、それらを少しでも改善できる可能性があれば、今後の新生児医療に大きく貢献するものと考えている。

本研究を基礎とし今後は NICU で治療されている新生児に対しピフィズス菌 (B. breve) の投与をおこない、腸内細菌叢が正常化できるかに関して検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Rothia mucilaginosa infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. Ochi F, Tauchi H, Moritani K, Yonezawa S, Miyamoto H, Suemori K, Ishii E. *Pediatr Blood Cancer*. 査読有り 2016 (Epub ahead of print)

(ア) DOI: 10.1002/pbc.26145

[Homologous Analysis Using Repetitive-sequence-based PCR Typing of Exfoliative Toxin-producing Staphylococcus aureus Isolated from Our Hospital]. Miyamoto H, Murakami S, Nishimiya T, Suemori K, Tauchi H. *Kansenshogaku Zasshi*. 2015 査読有り 89:369-74. 2015.

(ア) <http://europepmc.org/abstract/med/26552128>

Tsukamurella inchonensis infection in a child with Hodgkin's lymphoma. Ochi F, Tauchi H, Moritani K, Miyamoto H, Ohkusu K, Ishii E. *Pediatr Int*. 査読有り 57:e7-10. 2015.

DOI: 10.1111/ped.12472

Bacteriological characteristics of Arcanobacterium haemolyticum isolated from seven patients with skin and soft-tissue infections. Miyamoto H, Suzuki T, Murakami S, Fukuoka M, Tanaka Y, Kondo T, Nishimiya T, Suemori K, Tauchi H, Osawa H. *J Med Microbiol*. 査読有り 644:369-74. 2015 DOI: 10.1099/jmm.0.000038

Procalcitonin as a marker of respiratory disorder in neonates. Ochi F, Higaki T, Ohta M, Yamauchi T, Tezuka M, Chisaka T, Moritani T, Tauchi H, Ishii E. *Pediatr Int*. 査読有り 57:263-8. 2015

DOI: 10.1111/ped.12505

[学会発表](計 8 件)

Watanabe S, Kawakami N, Miyamoto H, Takatori S, Tanama M, Tanaka A, Tauchi H, Correlation between daptomycin susceptibility and teicoplanin resistance in Staphylococcus epidermidis. The 16th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection. 2016 年 12 月 1 日、メルボルン (オーストラリア)

Hisamichi Tauchi, Infection Control

for the Children's Cancer Patient, International Symposium of Chonnam National University Children's Hospital, 2016年11月3日、光州(韓国)

〔図書〕(計5件)

篠田邦大、田内久道、小児がん支持療法マニュアル。医薬ジャーナル社、2016、【総論】輸血 【各論】DIC(播種性血管内凝固症候群)、鼻出血の管理 pp27-31, pp72-74, pp108

田内久道 感染制御学、文光堂、2015、第5章1.一般病棟 6.空気感染隔離室 9.透析室 10.リハビリテーション室、pp162-164, 179-180, 187-191

田内久道、小児血液腫瘍学、診断と治療社、2015 第3章6.A 移植片対宿主病、pp191-193

田内久道 針刺し・切創、皮膚・粘膜暴露、職業感染防止対策Q&A 国立大学附属病院感染対策協議会 職業感染対策作業部会編、じほう、2015、pp7-11

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田内 久道(Tauchi, Hisamichi)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30314959

(2)研究分担者

石井 榮一(Ishii, Eiichi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20176126

江口 真理子(Eguchi, Mariko)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40420781