

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：30122

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17931

研究課題名（和文）離乳食の新たな指標としての α-ディフェンシンによる腸内細菌叢制御の解明

研究課題名（英文）Study on the regulation of the intestinal environment in infants by alpha defensin during complementary feeding

研究代表者

高桑 暁子（Takakuwa, Akiko）

天使大学・看護栄養学部・講師

研究者番号：20622129

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳児を母乳群と乳児用調整乳群に分け生後7日～11ヵ月までの期間で採取した糞便のHD5濃度の測定および腸内細菌叢の構成を比較した。母乳と乳児用調整乳による乳児期の栄養方法の違いや離乳食の導入によって α-ディフェンシンの分泌に有意な差は見られなかったが、腸内細菌叢の多様性や占有率に影響を及ぼすことを明らかにした。また、母乳栄養では生後9～11ヵ月の離乳完了に向けた時期で α-ディフェンシン分泌量が増加した。これらの結果は乳幼児期の栄養摂取方法の違いが離乳後の α-ディフェンシン分泌に影響を与え、腸内細菌叢の発達に寄与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により母乳と乳児用調整乳という乳児期の栄養方法の違いが腸内細菌叢の多様性や占有率に影響を及ぼすことを明らかにした。また、乳児期の栄養方法の違いが固形食へと移行する時期の α-ディフェンシンの分泌に影響を及ぼし、腸内細菌叢の発達に寄与する可能性を示した。

乳幼児期における腸内細菌叢形成の乱れは、様々な疾病の発症に関わることから、栄養法の違いと α-ディフェンシン分泌量の関連を今後さらに明らかにすることで乳幼児期以降の疾病予防にも寄与すると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, HD5 concentration and the composition of intestinal microbiota in feces collected from 7 days to 11 months of age from infants divided into breast milk and formula milk groups were compared. Although there were no significant differences in α-defensin secretion between breast milk and formula milk, but there were differences in α-diversity and the intestinal microbiota composition. In breastfeeding, α-defensin secretion increased during the period from 9 to 11 months of age, toward the completion of weaning. These results indicate that differences in nutritional methods during infancy may influence the secretion of α-defensins after weaning and contribute to the development of the intestinal microbiota.

研究分野：栄養学

キーワード：Paneth細胞 α-ディフェンシン 離乳食 腸内細菌叢

離乳食の新たな指標としての α ディフェンシンによる腸内細菌叢制御の解明

1. 研究開始当初の背景

(1) Paneth 細胞が分泌する α ディフェンシン

小腸陰窩の基底部に位置する Paneth 細胞は、病原体にすばやく反応して抗菌ペプチド α ディフェンシンを分泌することで腸管自然免疫に貢献している。Paneth 細胞 α ディフェンシンにはヒトにおいて human defensin 5 (HD5) と HD6 があり、HD5 が強い殺菌活性を持つことが知られている (Ayabe T et al., Nat Immunol 2000)。また、マウスの α ディフェンシンである cryptdin は病原菌を強く殺菌する一方で、常在菌にはほとんど殺菌活性を示さない選択的殺菌活性により腸内細菌の排除と共生に関与すること (Masuda K et al., J Innate Immun 2011)、さらに HD5 遺伝子を発現するマウスの腸内細菌叢の構成が大きく変化する (Salzman NH et al., Nat Immunol 2010) ことから、Paneth 細胞 α ディフェンシンは腸内細菌叢の制御を介して腸内環境の恒常性維持に貢献していることが知られている (Nakamura K, Takakuwa A, et al., Biosci Microbiota Food Health 2016)。

(2) 乳幼児期における腸内環境

出生以降の1年間で乳幼児の腸内細菌叢は劇的に変化し、在胎期間、分娩方法、栄養摂取方法など様々な環境因子に影響を受けることが報告されている。特に乳児期の母乳あるいは乳児用調整乳という栄養方法の違いは腸内細菌叢の形成に大きく影響することが報告されている ()。さらに、離乳食導入以降は栄養源が母乳や乳児用調整乳から多様な食事成分に代わり、未消化な食事成分が下部消化管に降りてくる。細菌はそれぞれ栄養要求性が異なるため食事成分が豊富になることで腸内細菌叢の構成も多様になると考えられている。また、食事を摂取することは食品や腸内細菌を含む微生物といった外来因子に腸管免疫システムが遭遇することになり健全な腸管免疫システムの発達も起こる。この時期の腸管免疫システムの発達の障害はその後の疾患と関連することが報告されている。また、離乳完了後は成人型の腸内細菌叢として安定するためこの時期に正常なバランスの腸内細菌叢を形成することは、将来的な疾病予防の観点からも重要であると考えられる。

早産児は腸管が未発達であり、HD5 mRNA の発現が新生児、成人期と比べ低く、壊死性腸炎 (NEC) の発症の素因になる可能性があることが報告されている (Salzman NH et al., Pediatr Res. 1998)。以上のことから、Paneth 細胞が分泌する α ディフェンシンが乳幼児期における腸内環境の制御にも寄与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

Paneth 細胞の正常な発達と α ディフェンシンの分泌は、腸内細菌叢の形成を促し、乳児期の腸内環境の制御にも寄与するという仮説のもと、腸内細菌の変動の大きい乳汁栄養～離乳以降の α ディフェンシン分泌量と腸内細菌の多様性の関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

事前に研究について説明を行い、母親の同意を得られた出生児 10 名を対象とし、生後 7 日頃、生後 1 ヶ月頃、生後 4 ヶ月、生後 5～6 ヶ月 (離乳食開始 1 ヶ月後)、生後 7～8 ヶ月 (離乳食 2 回食導入 1 ヶ月後)、生後 9～11 ヶ月 (離乳食 3 回食導入 1 ヶ月後) の計 6 回糞便の採取を行った。さらに腸内細菌叢に影響を及ぼす要

因として① 出産状況について（在胎週数，分娩形態、出生体重、栄養方法）、② 離乳食の状況について（食品、量、たんぱく質の開始、授乳回数）情報の聞き取りを行った。

対象者には本研究の目的と意義，試験方法及び安全性について説明し、十分に理解したのちに同意を得た。検体の取り扱いには十分留意し保管した。本研究は天使大学倫理委員会承認を得て行った（天使大学研究倫理委員会 2018-08）。

(2) Sandwich ELISA を用いた糞便中の HD5 定量

糞便サンプルは凍結乾燥後ビーズ式破碎装置を用いて破碎した。糞便粉末 10 mgは 100 μ L の PBS(-)に懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで一晩ボルテックス混合した。4 $^{\circ}$ C、15,000 g で 30 分間遠心分離し、上清を糞便抽出物とした。

96 well のマイクロプレートに 100 μ L の補足抗体 (1 mg/mL in 50 mM 炭酸ナトリウム-重炭酸緩衝液 pH9.6) 入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩固相化した。ween20 を含む PBS (PBS-T) でプレートを洗浄後、200 μ L の 25%ブロックエース (DS Pharma Biomedicals)を加え、25 $^{\circ}$ Cで1時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去後、100 μ L の標準物質 (酸化 HD5) と糞便抽出物を加え、25 $^{\circ}$ Cで1時間補足抗体と反応させた。PBS-T で洗浄後、100 μ L の検出抗体溶液 (0.5 μ L/mL 39E-7 ビオチン化抗体)を加え、25 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。その後、100 μ L のホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識 Streptavidin (GE Healthcare、1 : 5000 となるよう PBS-T で希釈)を加え、25 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。洗浄後、100 μ L の 3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine (TMB) 基質緩衝液(SureBlue;Kirkegaard & Perry Laboratories)を加え、25 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。100 μ L の 0.6 N 硫酸を加え反応停止後、マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

(3) 16S rDNA メタゲノム解析

DNAQIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN、Hilden、Germany) をプロトコルに従い使用し、200 mg の糞便サンプルから全ゲノム DNA を抽出および精製した。最終的な DNA 濃度は、Nanodrop 2000 分光計 (Thermo Fisher Scientific) を使用して 260 nm の吸光度に基づき決定した。

各糞便 DNA サンプルにおける 16SrDNA の増幅は、16SrDNA の V3-V4 可変領域をカバーする Bakt341F (5-cctacgggnggcwgcag) および Bakt 805R (5-gactachvgggtatctaatcc) のユニバーサルプライマーセットを使用した PCR によって行った。最初の PCR は、12.5 ng の糞便 DNA、200 nM の各プライマー、および 1 \times KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (Kapa Biosystems)を含む 25 μ L の反応混合物で行い、目的の領域を増幅した。最初の PCR 産物は AMPure XP ビーズ(Beckman Coulter)で精製した。2回目の PCR 増幅は、5 μ L の最初の PCR アンプリコン、5 μ L の各インデックスプライマー、および 1 \times KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (Kapa Biosystems)を含む 50 μ L の反応混合物で、アダプター配列を付加した。各アンプリコンを精製し、Qubit dsDNA HS アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して定量、4 nM に調整した。2番目の PCR アンプリコンをそれぞれ 4 μ L プールし、KAPA Library Quantification Kit Lightcycler 480 qPCR Mix (Kapa Biosystems)を使用して定量し、4 pM に希釈した。アンプリコンライブラリーを 5%等モルの PhiX Control v3 (Illumina)で調整し、MiSeq 600-cycle v3 kit (Illumina)を使用しペアエンドシーケンスモードでシーケンスした。

(4) 統計学的解析

測定値は平均 \pm 標準誤差で示した。統計学的解析は Prism 6.07 ソフトウェアを用いて Student' s t-test を行い、危険率 5%未満 ($p < 0.05$) を有意とした。

4. 研究成果

乳汁栄養方法から完全母乳栄養を母乳群、乳幼児調製粉乳の割合が高い混合栄養を乳児用調整乳群に分け、結果を比較検討した。糞便の回収は生後7日目、生後1ヵ月、生後4ヵ月、生後5~6ヵ月（離乳食開始から1ヵ月経過）、生後7~8ヵ月（離乳食2回食から1ヵ月経過）、生後9~11ヵ月（離乳食3回食から1ヵ月経過）の計6回行った。

(1) 対象児の属性

| | 母乳群 (n=5) | 乳児用調整乳群 (n=5) |
|------------|---------------------------|---------------------------|
| 在胎週数 | 39.6±0.6 週 | 38.6±0.8 週 |
| 分娩形態 | 経膣分娩 5 人 | 経膣分娩 2 人、帝王切開 3 人 |
| 出生時体重 | 2955±115 g | 2727±142 g |
| 生後1ヵ月体重 | 3857±138 g | 3554±142 g |
| 生後4ヵ月体重 | 6438±447 g | 6454±254 g |
| 離乳食開始時期 | 157.8±5.1 日 (5.9 ヵ月±0.2) | 176.2±6.6 日 (5.3 ヵ月±0.2) |
| 離乳食2回食開始時期 | 206.8±7.1 日 (6.9 ヵ月±0.2) | 198.8±10.4 日 (6.2 ヵ月±0.4) |
| 離乳食3回食開始時期 | 282.0±12.8 日 (9.4 ヵ月±0.4) | 278.0±4.8 日 (9.3 ヵ月±0.2) |

(2) Sandwich ELISA による糞便中 HD5 濃度の定量

まず、母乳と乳児用調整乳の栄養方法の違いによる乳児の糞便中 HD5 濃度を比較するため、Sandwich ELISA による HD5 濃度の定量を行った(図1)。生後7日では母乳群が 5.56±1.16 ng/mL、乳児用調整乳群が 4.21±0.64 ng/mL、生後1ヵ月では母乳群が 9.13±2.39 ng/mL、乳児用調整乳群が 5.51±0.32 ng/mL、生後4ヵ月では母乳群が 6.13±0.71 ng/mL、乳児用調整乳群が 5.25±0.65 ng/mL と乳汁栄養期間で母乳群の HD5 濃度が高く推移した。離乳食導入1ヵ月後の5~6ヵ月の HD5 濃度は母乳群が 5.13±2.39 ng/mL、乳児用調整乳群が

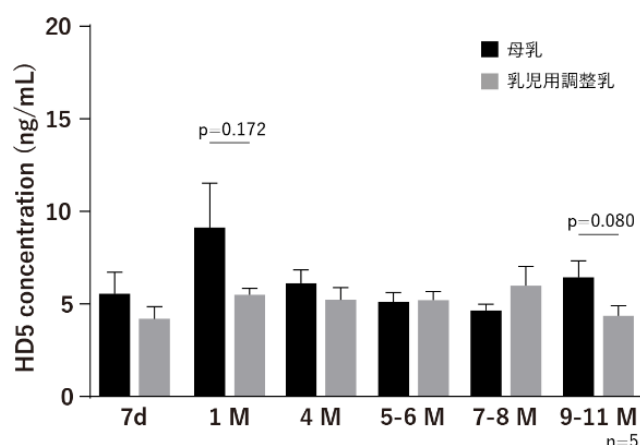


図1. 栄養方法の違いによる乳児の便中HD5濃度の経時的推移

5.22±0.45 ng/mL と差が見られなくなった。離乳食の回数を2回にしてから約1ヵ月後の7~8ヵ月は、母乳群が 4.66±0.34 ng/mL、乳児用調整乳群 6.01±1.04 ng/mL と乳児用調整乳群が高くなり、離乳食の回数を3回にしてから1ヵ月後の生後9~11ヵ月は母乳群 6.46±0.89 ng/mL、乳児用調整乳群 4.37±0.54 ng/mL と母乳群が再び高い傾向を示した。

(3) 腸内細菌叢の多様性解析

次に、メタゲノム 16S rDNA 解析を行い、母乳群と乳児用調整乳群で腸内細菌叢の組成を比較した(図2)。腸内細菌叢のα多様性の指標である Shannon index は、生後4ヵ月(母乳群 2.78±0.23、乳児用調整乳群 3.76±0.27) 生後5~6ヵ月(母乳群 3.01±0.28、乳児用調整乳群 3.94±0.19) で乳児用調整乳群

が有意に高かった。また、腸内細菌叢の α 多様性は乳幼児の成長とともに高くなった。

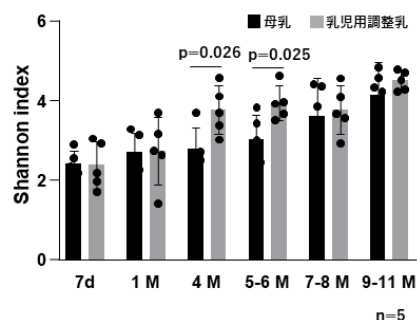


図2. 栄養方法の違いによる α 多様性の推移

(4) 腸内細菌叢の占有率

最後に、門レベルでの腸内細菌占有率の比較を行った (図3)。Proteobacteria

(図3B) は生後4ヵ月で母乳群が乳児用調整乳群と比較して有意に高く (母乳群 $18.20 \pm 5.24\%$ 、乳児用調整乳 $4.26 \pm 1.51\%$)、Firmicutes (図3D) は生後4ヵ月で乳児用調整乳群と比較して母乳群で少ない傾向を示した (母乳群 $19.68\% \pm 12.07\%$ 、乳児用調整乳 $44.66 \pm 4.67\%$)。4ヵ月で見られた Proteobacteria 占有率の差は生後5~6ヵ月では小さくなり (母乳群 $8.86 \pm 3.20\%$ 、乳児用調整乳群 $4.16 \pm 0.85\%$)、生後7~8ヵ月では、再度母乳群が乳児用調整乳群より有意に高かった (母乳群 $14.89\% \pm 4.20\%$ 、乳児用調整乳群 $2.92\% \pm 0.94\%$)。Actinobacteriota、Bacteroidota は期間を通して有意な差は見られなかった。

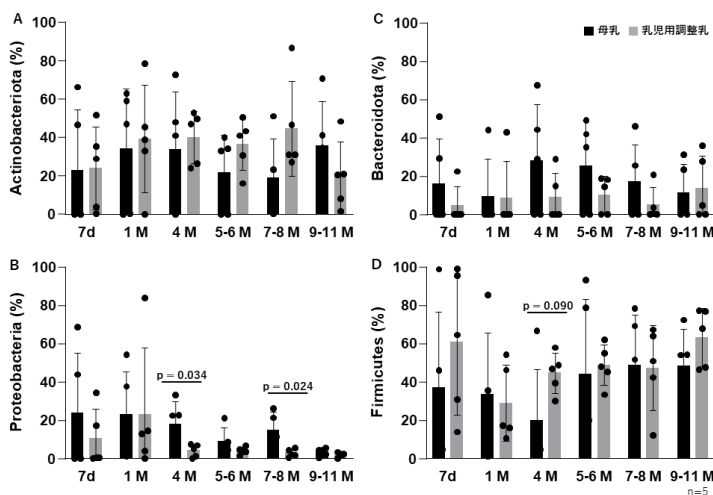


図3 栄養方法の違いによる腸内細菌叢の占有率

母乳と乳児用調整乳という乳児期の栄養方法で検討した結果、HD5 濃度は有意な差が見られず、腸内細菌叢の多様性や占有率に影響を及ぼすことが明らかになった。乳児用調整乳の腸内細菌叢の多様性が母乳より高いことはこれまでも多く報告されている。HD5 濃度に有意な差が見られなかったことは、乳児用調整乳群は乳児用調整乳の割合が1日の摂取エネルギーの半分以上であるが母乳も摂取していたため、その影響が考えられた。また、離乳食の導入による HD5 濃度や腸内細菌叢の多様性への影響は見られなかった。この理由として、離乳食導入後も母乳および乳児用調整乳の摂取は継続しており、本研究で検討した期間では授乳による影響が大きい可能性が考えられた。腸内細菌叢の α 多様性は乳幼児の成長とともに高くなり、乳幼児調整乳群は離乳食導入の前後で有意に高く、離乳完了に向けて母乳群と乳児用調整乳群での差が小さくなった。しかし、母乳栄養では固形食への移行が進んだ生後9~11ヵ月で HD5 濃度が高い傾向を示したことから、乳児期の栄養方法の違いが α ディフェンシンの分泌を介して腸内細菌叢の形成と発達に寄与する可能性が考えられた。

6. 主な研究発表論文等

特になし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Takakuwa Akiko, Nakamura Kiminori, Kikuchi Mani, Sugimoto Rina, Ohira Shuya, Yokoi Yuki, Ayabe Tokiyoshi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Butyric Acid and Leucine Induce -Defensin Secretion from Small Intestinal Paneth Cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nutrients | 6. 最初と最後の頁 2817 ~ 2817 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu11112817 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|-------|--|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 中村 公則 (Nakamura Kiminori) (80381276) | 北海道大学・先端生命科学研究院・准教授 | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |