

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04056

研究課題名（和文）乳幼児腸内細菌叢の再構成プロセスに関する研究

研究課題名（英文）Study for the reconstitution process of infant gut flora

研究代表者

今大路 治之（中山治之）（Imahji, Haruyuki）

香川大学・医学部・講師

研究者番号：80294669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：抗菌薬投与を受けた乳幼児を対象として、抗菌薬投与前後の腸内細菌叢の菌叢組成解析や機能メタゲノム解析を縦断的に行ったところ、回復期初期から回復期に増加する機能として、オリゴ糖輸送系、ポリアミンの合成と輸送、および抗菌ペプチド輸送に関与する機能が同定された。これらの代謝機能は Bifidobacteriaceaeをはじめとした複数の細菌群に由来していることから、微生物間の共生的代謝ネットワークにより腸内フローラの再生が促されていると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショットガンメタゲノム解析およびMAPLE解析を組み合わせた新規の解析手法を用いて抗菌薬暴露によって破綻した腸内細菌叢の回復プロセスに関与する複数の代謝機能を同定できたことは非常に画期的である。また今回の検討から、乳幼児腸内フローラの再生と安定化に関連する物質の候補としてポリアミンを同定したが、当該物質を新規プロバイオティクスとして用いることによって腸内フローラの破綻に起因する様々な疾患を予防する臨床的介入法の確立につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We conducted a longitudinal analysis of the bacterial flora composition and functional metagenomics of the intestinal microbiota before and after antimicrobial treatment in infants. We identified functions involved in the oligosaccharide transport system, polyamine synthesis and transport, and antimicrobial peptide transport as functions that increase during the recovery period. These metabolic functions were derived from multiple bacterial groups, including Bifidobacteriaceae, suggesting that a symbiotic metabolic network among microorganisms promotes the regeneration of intestinal flora.

研究分野：細菌学

キーワード：腸内細菌叢 乳幼児 MAPLE 機能メタゲノム解析 抗菌薬暴露

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管には 1,000 種、100 兆個にも及ぶ細菌が定着し、腸内フローラを形成している。腸内フローラは食物の消化、微量栄養素の供給、免疫賦活や種々の薬物代謝、さらには外来病原体との競合作用など、宿主にとって有益な生理活性を担っている。腸内フローラは非常に安定した生態系であるが、過度のストレス、偏食、抗菌薬投与などによってその構成や生理活性が変化する。この腸内フローラの破綻 (dysbiosis) が、アレルギー、肥満、糖尿病、炎症性腸疾患、精神疾患などの発症リスクを高めることが報告されている。腸内フローラの構成は年齢によって変化するが、2~3 歳頃までに成人型の腸内フローラが形成され安定化する。新生児期から乳幼児期の腸内フローラは不安定であるにも関わらず、抗菌薬を投与される機会が多い。抗菌薬暴露による乳幼児腸内フローラの破綻はその後の菌叢形成に影響を及ぼし、成長後の疾患感受性を上げると考えられている。例えば生後 6 ヶ月までの抗菌薬暴露は小児喘息や肥満の発症リスクを上げることが報告されている。抗菌薬の腸内フローラに対する影響については、メタ 16S rDNA 解析により検証されており、新生児期から乳幼児期の最優勢菌である *Bifidobacterium* が最も影響を受けやすいことが報告されている。しかしながら、抗菌薬投与などによって攪乱された腸内フローラの再構成プロセスを機能的に解析した報告は皆無である。抗菌薬投与を受けた約 3 割の乳幼児では、腸内フローラの破綻が 3 ヶ月以上にわたって持続するとされている。我々は  $\beta$  ラクタム剤服用後に腸内フローラの質的かつ量的な異常が 2 ヶ月にわたって持続した母乳栄養児の例を経験している。また、抗菌薬暴露を受けた複数の乳幼児の腸内フローラの解析から、抗菌薬暴露後に腸内フローラの破綻が長期に持続する乳幼児が一定割合存在することを確認している。同一の抗菌薬を同量服用した乳幼児でも腸内フローラへの影響には個人差が認められることから、抗菌薬投与による影響から「回復しやすい腸内フローラ」と「回復しにくい腸内フローラ」の存在が示唆される。また、両者間の回復度の違いが、腸内フローラのどのような代謝機能ポテンシャルの違いに起因するのかが未解明である。なぜ、抗菌薬投与中止後も長期にわたり菌叢が回復しないのか、抗菌薬投与によってどのような腸内フローラ機能が失われ、あるいは増加するのか、どのような機能が腸内フローラの回復や安定化に重要なのか、これらの疑問に迫る知見はこれまでにない。そこで今回、抗菌薬による腸内フローラの破綻を題材として、その再生に関与する腸内フローラ機能を同定することにより、腸内フローラの破綻に起因する様々な疾患への治療的介入法を開発する糸口になると考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、香川大学医学部附属病院に入院中の抗菌薬投与を受けた乳幼児を対象として、抗菌薬投与前後の腸内フローラのメタゲノム解析を生後 1 ヶ月から離乳期まで縦断的に行った。収集したデータから、抗菌薬投与後の菌叢回復が遅延する症例の頻度とその菌叢の特徴を捉え、抗菌薬暴露によって破綻した腸内フローラを速やかに回復させる代謝機能を同定することを研究目的とした。

乳幼児期の腸内フローラに対する抗菌薬の影響については数多くの報告があり、腸内フローラの破綻がその後の成長過程におけるアレルギーや肥満などの発症リスクを上昇させることが示されているとはいえ、これらの報告の全ては残念ながら培養法あるいは次世代シーケンサーを用いたメタ 16S rDNA 解析による菌組成解析に留まっている。そこで本研究では、腸内機能メタゲノム解析を行うことによって腸内フローラの再構成プロセスにおける機能的変動を解析した。膨大な数のメタゲノム配列情報を用いて腸内細菌叢の機能を比較するためには、効率良く代謝機能ポテンシャルの変動を捉えるツールが必要となる。そこで今回、MAPLE (Metabolic and Physiological Potential Evaluator) と呼ばれる評価システムを用いる。MAPLE は KEGG データベースに登録された機能モジュール (代謝パスウェイから切り出された合成、分解、輸送機能などに関連する 730 の個別反応経路) にメタゲノム配列をマッピングし、MCR やアバンダンス (マッピングされる read 数) を算出することによりサンプル間での代謝機能の変動を評価するシステムである。この評価システムを用いることによって乳幼児腸内フローラの再生と安定化に関連する代謝機能を網羅的に同定した。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳幼児便検体の処理

香川大学医学部附属病院に入院中の乳幼児 4 名 (親権者からインフォームド・コンセント取得) から生後 1 日目から経時的に得た 24 便検体 (香川大学研究倫理審査会承認済) を解析に用いた。各検体の DNA はアクロモ法により抽出した。また腸内フローラの菌数の変化はグラム染色および DAPI 染色により評価した。

### (2) ショットガンメタゲノム解析および MAPLE 解析

抽出した DNA を対象に HiSeq シークエンシステム (Illumina) を用いて各サンプルあたりランダムに抽出した 100 万リードのメタゲノム配列データを取得した。得られたメタゲノム情報よりリボソームタンパク質遺伝子にヒットするリード数をカウントすることでより精度の高

い菌叢解析を行うとともに、KEGG に登録されている機能モジュールを利用した生理・代謝機能ポテンシャル評価法である MAPLE を用いて抗菌薬暴露前後に変動する代謝機能を検索した。機能モジュールアバンダンスに基づいた生物群集解析および階層的クラスタリング解析は、PRIMER v7 (PRIMER-e)を用いて行った。

### (3) *Bifidobacterium breve* のポリアミンに対する増殖応答性

乳幼児から分離した *Bifidobacterium breve* ARM4-1 株の増殖における各種ポリアミンの影響は、BHIS 液体培地にオルニチン、アグマチン、スペルミジン、スペルミン、プトレシンをそれぞれ 0-10 mM に添加することで比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 抗菌薬暴露後の乳幼児腸内フローラ変動の解析

真正細菌におけるリボソームタンパク質の遺伝子数は全て 52 個と一定であるため、リボソーム

タンパク質遺伝子にヒットするリード数をカウントすることで正確な菌組成の把握が可能である。そこで、HS、NEO2、NEO3、UC2 の乳幼児 4 名の便検体から得られたメタゲノムデータより family レベルでの菌叢解析を行った (図 1)。一般的に乳幼児の菌叢は主に *Bifidobacteria* 科が占める。今回の検体も回復期 (あるいは正常時)には *Bifidobacteria* 科 (青バー)

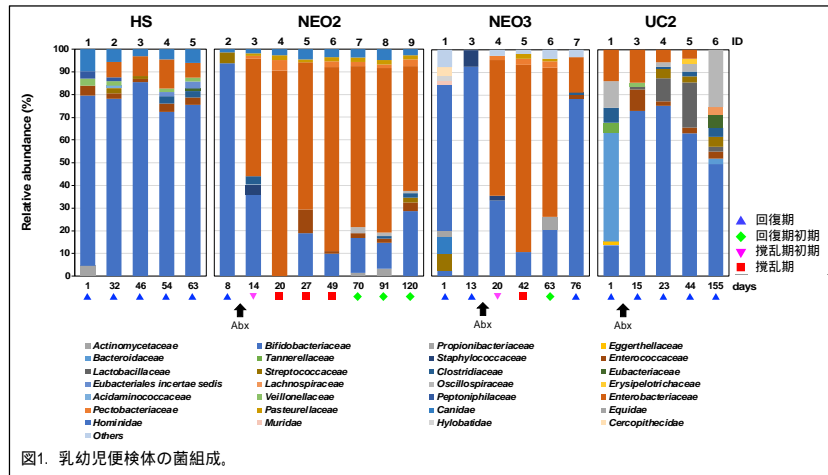


図1. 乳幼児便検体の菌組成。

が優勢であるが、抗菌剤の投与後に *Bifidobacteria* 科の著しい減少が認められた。今回の解析では、抗菌剤投与によって *Bifidobacteria* 科の割合が減少傾向にある時期を攪乱期 (赤四角)

とし、逆に回復傾向にある時期を回復期 (青三角)とした。さらに攪乱期の初期段階を攪乱期初期 (ピンク逆三角) および回復期の初期段階を回復期初期 (緑ダイヤ) と定義した。

次に、各検体の *Bifidobacterium* 間における菌種構成の経時的変動を調べた (図 2)。その結果、概して *Bifidobacterium* の菌種構成は比較的安定しており、どの検体も *B. breve* が優勢であった。ただし UC2 検体のみ時間の経過とともに *B. breve* の割合が減少した。

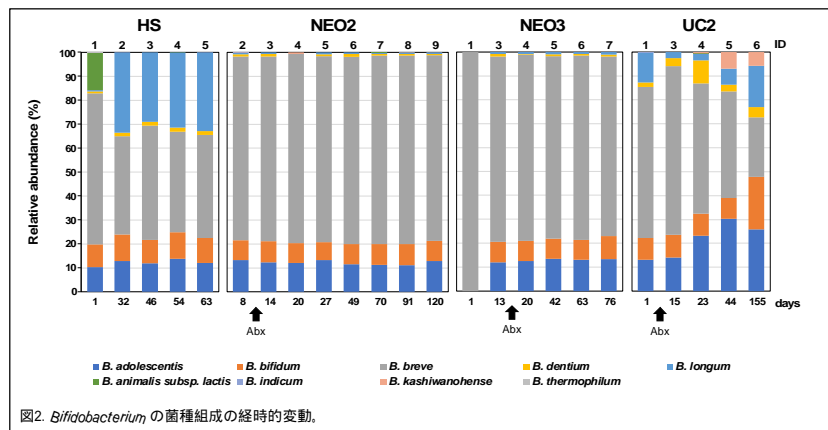


図2. *Bifidobacterium* の菌種構成の経時的変動。

### (2) 抗菌薬投与後に変動する腸内フローラ機能の同定

MAPLE 解析により得られた機能モジュールアバンダンスに基づいた生物群集解析を行った (図 3)。

A は、菌叢の破

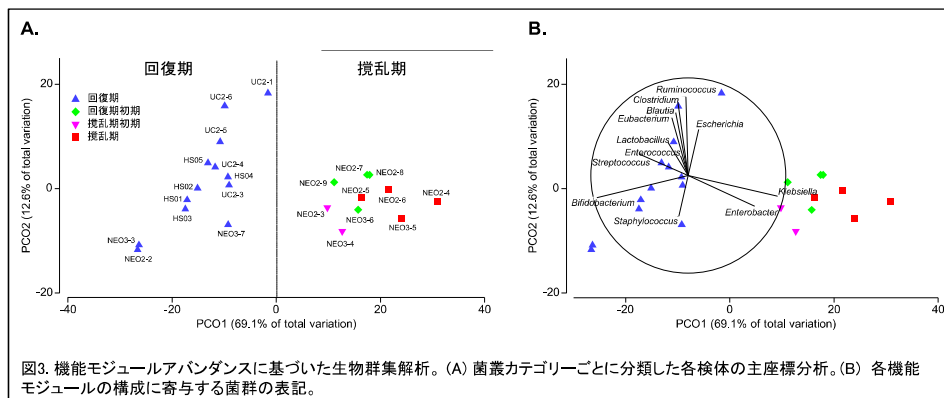


図3. 機能モジュールアバンダンスに基づいた生物群集解析。(A) 菌叢カテゴリーごとに分類した各検体の主座標分析。(B) 各機能モジュールの構成に寄与する菌種の表記。

綻度合いによ  
って4つのカ  
テゴリーに分  
類した各検体  
の主座標分析  
結果を示した。  
その結果、明  
確に回復期と  
攪乱期で分け  
られ、それぞ  
れの間に関能  
ポテンシャル  
の明らかな差  
が認められ

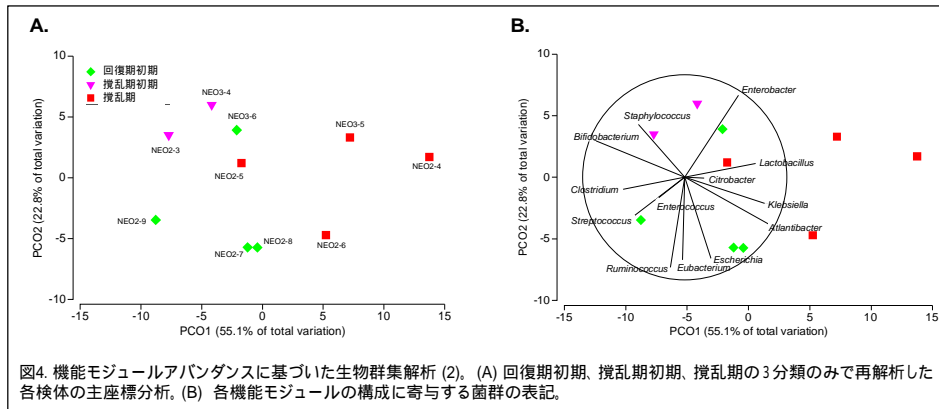


図4. 機能モジュールアバンダンスに基づいた生物群集解析 (2)。 (A) 回復期初期、攪乱期初期、攪乱期の3分類のみで再解析した各検体の主座標分析。 (B) 各機能モジュールの構成に寄与する菌群の表記。

た。また、この機能ポテンシャルの差がどのような菌種によってもたらされているのかをオー  
バーレイした結果をBに示した。回復期の機能に最も寄与しているのは *Bifidobacterium* であるが、  
それ以外にも *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium* などが寄与していた。一方、攪  
乱期の機能には腸内細菌科に属する *Klebsiella* などの菌群が大きく影響していた。

さらに、回復期初期、攪乱期初期、攪乱期の3分類のみで再解析した(図4-A)。その結果、  
攪乱期(赤四角)のサンプルとそれ以外では類似性が異なっていた。また、回復期初期の機能ポ  
テンシャルに大きく寄与している菌種として *Streptococcus*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Ruminococcus*,  
*Eubacterium* が抽出された(図4-B)。

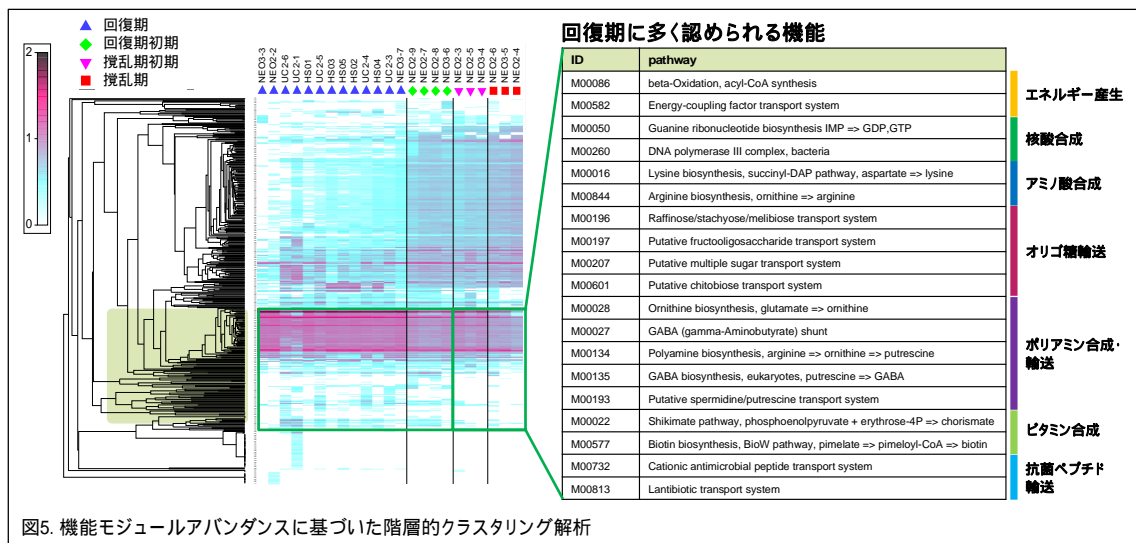
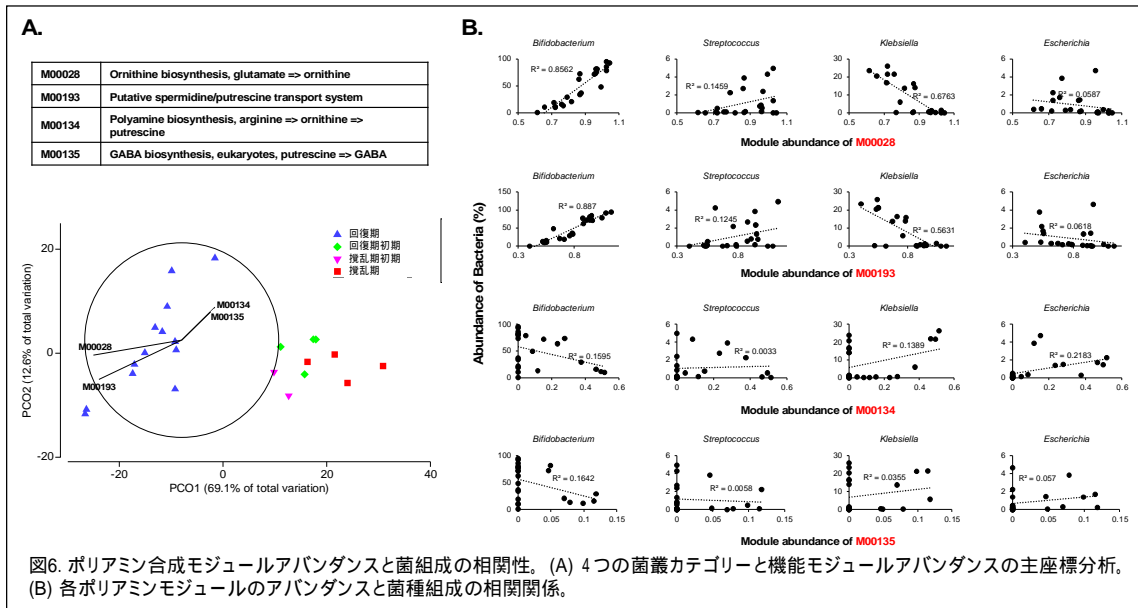


図5. 機能モジュールアバンダンスに基づいた階層的クラスタリング解析

次に、各ステージごとに機能モジュールアバンダンスに基づいて階層的クラスタリング解析  
を行いどのような機能に違いが認められるのかを調べた(図5)。その結果、攪乱期初期や攪乱  
期において少ない機能で、かつ回復期や回復期初期で比較的多く認められる機能が複数同定さ  
れた(緑枠線)。具体的には回復期に多く認められる機能として、エネルギー産生系、核酸・ア  
ミノ酸合成、オリゴ糖輸送、ポリアミンやビタミン合成、あるいは抗菌ペプチド輸送に関連する  
機能が上げられた。

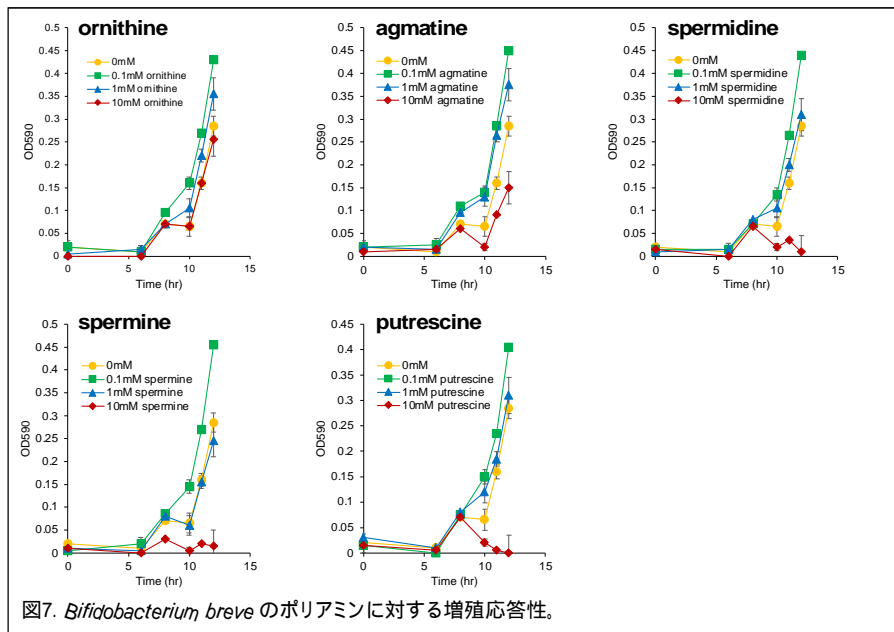
次に回復期に多く認められる機能として、ポリアミンの合成や輸送に関連する機能がいくつ  
か同定されたので、それらのポリアミン合成関連モジュールアバンダンスがどのような菌種構  
成と相関しているのか解析した(図6)。Aは、4つの菌叢カテゴリーと機能モジュールアバン  
ダンスの主座標分析結果で、これに4つのポリアミン合成モジュール(M00028, M00193, M00134,  
M00135)をオーバーレイした。その結果、明らかにM00028およびM00193とM00134および  
M00135では菌叢ステージによってそれらのアバンダンスが異なっていた。つまり、M00028お  
よびM00193は回復期に多く認められる機能で、M00134およびM00135は回復期初期から回復  
期にかけて比較的多く認められる機能であった。Bでは、各ポリアミンモジュールのアバン  
ダンスと菌種組成の相関関係を示した。その結果、M00028やM00193の機能強度は *Bifidobacterium*  
や *Streptococcus* の菌種割合と相関しているが、*Klebsiella* や大腸菌とは逆相関していた。また反  
対に、M00134やM00135の機能強度は *Klebsiella* や大腸菌の菌種割合と弱く相関していたが、  
*Bifidobacterium* や *Streptococcus* との相関性は低いということが判明した。つまり、攪乱期から回  
復期にかけて多く認められるポリアミンの合成・輸送に関連する機能は、*Bifidobacterium* のみならず腸内細菌科や *Streptococcus* などの複数の菌群間の共生的代謝ネットワークが関わっている  
ことが推察された。



### (3) *Bifidobacterium breve* のポリアミンに対する増殖応答性

ポリアミン合成機能が回復移行期に多く認められることから、ポリアミンが回復プロセスに関わる候補物質の一つとして考えられる。そこで回復期における最優性菌である *B. breve* の増殖におけるポリアミンの影響を検討した(図7)。その結果、検討したポリアミン(オルニチン、アグマチン、スペルミジン、スペルミン、プトレシン)を培地に0.1 mM添加することによって添加しない場合(黄色)と比べて、*B. breve* の増殖が促進された。

本研究の結果から、抗菌薬投与によって機能アバundanceが消失する代謝モジュールや回復期に増加する代謝モジュールが複数同定された。特に回復期初期から回復期に増加する機能として、オリゴ糖輸送系、ポリアミンやビタミンの合成と輸送、および抗菌ペプチドの合成と輸送に関与する機能などが同定された。こ



これらの代謝機能は *Bifidobacteriaceae* のみならず *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae* に由来していることから、微生物間の共生的代謝ネットワークにより腸内フローラの再生が促されていると推察された。また今回の検討から、回復プロセスに関わる物質で *B. breve* に対する増殖促進物質の候補としてポリアミンが示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Goda Hisataka, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Yamaoka Hitoshi, Tada Ayano, Nagao Tamiko, Fujisawa Tomohiko, Koyama A. Hajime, Kuwahara Tomomi	4. 巻 28
2. 論文標題 Inactivation of human norovirus by chlorous acid water, a novel chlorine-based disinfectant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 67～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2021.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Elahi Miad, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Hashimoto Masahito, Tada Ayano, Yamasaki Hisashi, Nagao Tamiko, Kuwahara Tomomi	4. 巻 10
2. 論文標題 The Human Gut Microbe Bacteroides thetaiotaomicron Suppresses Toxin Release from Clostridium difficile by Inhibiting Autolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 187～187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics10020187	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 -
1. 著者名 Kajitani Rei, Noguchi Hideki, Gotoh Yasuhiro, Ogura Yoshitoshi, Yoshimura Dai, Okuno Miki, Toyoda Atsushi, Kuwahara Tomomi, Hayashi Tetsuya, Itoh Takehiko	4. 巻 49
2. 論文標題 MetaPlatanus: a metagenome assembler that combines long-range sequence links and species-specific features	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e130～e130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Williams Maggie R., Stedtfeld Robert D., Stedtfeld Tiffany M., Crawford Robert B., Kuwahara Tomomi, Kaminski Norbert E., Tiedje James M., Hashsham Syed A.	4. 巻 797
2. 論文標題 MicroRNA-based host response to toxicant exposure is influenced by the presence of gut microbial populations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 149130～149130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2021.149130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ezeji Jessica C., Sarikonda Daven K., Hopperton Austin, Erkkila Hailey L., Cohen Daniel E., Martinez Sandra P., Cominelli Fabio, Kuwahara Tomomi, Dichosa Armand E. K., Good Caryn E., Jacobs Michael R., Khoretonenko Mikhail, Veloo Alida, Rodriguez-Palacios Alexander	4. 巻 13
2. 論文標題 Parabacteroides distasonis: intriguing aerotolerant gut anaerobe with emerging antimicrobial resistance and pathogenic and probiotic roles in human health	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut Microbes	6. 最初と最後の頁 1922241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19490976.2021.1922241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Dai, Eguchi Hiroshi, Kuwahara Tomomi, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Inaba Masamaru, Itoi Motozumi, Ueda Kiichi, Ohashi Yuichi, Sado Kazushige, Mizutani Satoshi, Miyamoto Hitoshi, Sasaki Shin-ichi, Shimizu Yumiko, Inoue Yoshitsugu	4. 巻 10
2. 論文標題 Presence of Acanthamoeba and diversified bacterial flora in poorly maintained contact lens cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69554-2	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 -

1. 著者名 Tada Ayano, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Yamasaki Hisashi, Elahi Miad, Nagao Tamiko, Yagi Hirofumi, Ishikawa Masao, Shibuya Koji, Kuwahara Tomomi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of thymoquinone on Fusobacterium nucleatum-associated biofilm and inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 643 ~ 650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11136	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 -

1. 著者名 Hotta Fumika, Eguchi Hiroshi, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Kuwahara Tomomi, Tada Ayano, Yagi Hirofumi, Shimomura Yoshikazu, Kusaka Shunji	4. 巻 46
2. 論文標題 Microbiome analysis of contact lens care solutions and tear fluids of contact lens wearers: Possible involvement of streptococcal antigens in allergic symptoms related to contact lens wear	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1367 ~ 1376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2020.4678	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 -

1. 著者名 Fujii Takayuki, Chiba Yoichi, Nakayama-Imahiji Haruyuki, Onishi Shun, Tanaka Aya, Katami Hiroto, Kaji Tatsuru, Ieiri Satoshi, Miki Takanori, Ueno Masaki, Kuwahara Tomomi, Shimono Ryuichi	4. 巻 54
2. 論文標題 Partially hydrolyzed guar gum alleviates small intestinal mucosal damage after massive small bowel resection along with changes in the intestinal microbiota	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 2514 ~ 2519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2019.08.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今大路治之、豊田敦、高見英人、田中彩、下野隆一、桑原知巳
2. 発表標題 乳幼児腸内フローラの再構成プロセスにおける代謝機能変動
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原知巳、多田彩乃、今大路治之
2. 発表標題 歯周病関連細菌の環境適応と病原性との関連
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今大路治之、Miad Elahi、橋本雅仁、多田彩乃、桑原知巳
2. 発表標題 ヒト腸内常在菌によるClostridioides difficile毒素の放出抑制
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 今大路治之、田中彩、下野隆一、豊田敦、高見英人、桑原知巳
2. 発表標題 抗菌薬暴露後に変動する乳幼児腸内フローラの代謝機能
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	桑原 知巳 (Kawahara Tomomi) (60263810)	香川大学・医学部・教授  (16201)	
研究分担者	高見 英人 (Takami Hideto) (70359165)	東京大学・大気海洋研究所・特任研究員  (12601)	
研究分担者	豊田 敦 (Toyoda Atsushi) (10267495)	国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・特任教授  (63801)	
研究分担者	下野 隆一 (Shimono Ryuichi) (60404521)	香川大学・医学部・准教授  (16201)	
研究分担者	田中 彩(西村彩) (Tanaka Aya) (30459200)	香川大学・医学部附属病院・助教  (16201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	小谷野 耕佑 (Koyano Kousuke)  (20437685)	香川大学・医学部附属病院・助教  (16201)	
研究分担者	中村 信嗣 (Nakamura Shinji)  (30437686)	香川大学・医学部附属病院・助教  (16201)	

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