

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461643

研究課題名(和文) 消化管粘膜における免疫応答からみた低出生体重児に対するプロバイオティクスの有用性

研究課題名(英文) Effects of probiotics on gut mucosal immune response in low birth weight infants.

研究代表者

清水 俊明 (SHIMIZU, Toshiaki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30260889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：まずL.reuteri、L. brevis、B.breveの菌数の調整を行い、増殖培養を行った。続いて、Caco-2細胞の培養条件を検討し、単層細胞培養を膜の抵抗値を測定することにより確認した。次に新生仔マウスを母乳群と生後3日より人工哺育する群とに分け、免疫担当細胞の数や細胞組成の変化について解析したところ、人工乳群において自然免疫細胞やCD8+T細胞が母乳群に比較して腸管のみならず全身性に活性化された。さらに生後1日からの低出生体重児へのB.breve (M-16V) 投与により1か月と1歳のサンプルからM-16Vと考えられる細菌が検出され、生後早期に投与したB.breveの定着が確認された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate effects of Lactobacillus reuteri, Lactobacillus brevis and Bifidobacterium breve on the tight junction function of Caco-2 monolayer culture we established the measurement of TEER (transepithelial electrical resistance) using volt-ohm meter. Newborn BALB/c mice were divided into dam-rearing pups and pups reared with milk substitute from 3-day-old using a hand-feeding system. In milk substitute-fed group, immune cells, such as the innate immune cells and CD8+T cells, were systemically more activated compared to those in dam-rearing group. We observed a colonization of Bifidobacterium. breve (M-16V) in low birth weight infants by administration of M-16V from soon after their birth detecting M16-V from stools of those infants ages at 1 month and 1 year. This finding shows the importance of early administration of probiotics in low birth weight infants.

研究分野：医歯薬学

キーワード：プロバイオティクス 消化管粘膜 免疫応答 低出生体重児 母乳 腸内細菌

1. 研究開発当初の背景

(1)近年の新生児医療の充実により低出生体重児の生命予後は、たとえ 1500g 未満の極低出生体重児であっても極めて良好となっている。しかしながら、児のインタクトサバイバルを目指すためには、十分な栄養の供給と、感染症や児の未熟性に起因する種々の合併症を防止することが非常に重要と考えられる。その意味から低出生体重児の消化管機能を改善し、感染予防効果を有し、新生児壊死性腸炎(necrotizing enterocolitis: NEC)や消化管アレルギーの発症を抑えることが知られているプロバイオティクスの投与が、現在多くの施設で行われている。最近、プロバイオティクスの安全性や有効性などについて全国 61 の *Bifidobacterium breve*(*B.breve*)の投与を行っている新生児関連施設にアンケート調査を行ったところ、安全性は確立されているもののその有用性あるいは有効な投与方法は、未だ検討を要するという結果であった(久田, 清水, 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011)。

(2)プロバイオティクスについての研究に関して、これまでに私たちは低出生体重児を対象に *B.breve* の投与により正常な腸内細菌叢の早期確立が望めること(Li, Shimizu, et al. *Pediatr Int*, 2004)、NEC や重症感染症の予防が可能であること(Satoh, Shimizu, et al. *Int J Probiotics Prebiotics*, 2007)、またラットを用いた実験によって、*B.breve* が TGF- β の発現を誘導すること(Fujii, Shimizu, et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006)、炎症関連遺伝子の発現に影響を与えること(Ohtsuka, Shimizu, et al. *Pediatr Res*, 2012)などを報告してきた。しかしながら実際の臨床においては、*B.breve* の単独投与では重症感染症の発症を十分にコントロールするまでには至っておらず、これらの感染症が様々な合併症の増悪因子になっていることも否定できない。

(3)これまで消化管粘膜における免疫応答は、CD4 陽性 T 細胞における 'Th1/Th2 サイトカインバランス' 仮説に基づいて考えられてきたが、近年、免疫を抑制する能力を有する制御性 T 細胞 (Treg 細胞) および感染防御能を有するが自己免疫疾患や炎症に関与する Th17 細胞の重要性が注目されている。さらに、Treg 細胞や Th17 細胞の誘導については腸内細菌が関与していることが証明されており、Treg 細胞は *Clostridium* や *Bacteroides* によって、Th17 細胞はマウスでは *Segmental filamental bacteria*(*SFB*) によってまたヒトでは *Faecalibacterium prausnitzii*(*FP*) により誘導されることが知られている。これまで T 細胞は最終的な effector 細胞になると他の細胞には変化しないとされていたが、T 細胞間でも環境により表現型が変わることがわかり、可塑性という概念が構築されつつある。すなわち、プロバイオティクスの投与によって腸内細菌を含めた腸内環境の変化が生じ、T 細胞が誘導され免疫抑制や感染制御あるいは炎症惹起に関与する T 細胞に表現型を変化させると考えられるが、現時点で低出生体重児へのプロバイオティクスの投与がこれらの消化管粘膜における Treg 細胞や Th17 細胞を介した免疫応答系にどのような影響を及ぼしているかについては解明されていない。

(4)プロバイオティクスによる低出生体重児の消化管粘膜における免疫応答に影響を及ぼす要因として、投与するプロバイオティクスの菌種の違いが挙げられる。近年欧米において *Lactobacillus reuteri*(*L.reuteri*)の有用性について多くの報告がなされている。低出生体重児においても NEC の発症防止や感染症の予防効果などの報告があるが、現在までのところわが国での低出生体重児に対する使用経験の報告はない。また、*Lactobacillus brevis*(*L.brevis*)はわが国で発見された安全性に優れる植物性乳酸菌

であり、免疫調節能や感染制御作用などが動物実験レベルでは証明されているがヒトでの応用の報告は少ない。さらに、投与菌の腸管内定着能も免疫応答に影響を及ぼす重要な要因と考えられるが、現在までのところ各プロバイオティクスにおける腸管内定着能と消化管免疫との関係は明らかにされていない。

2. 研究の目的

低出生体重児とくに極低出生体重児に対するプロバイオティクス投与の腸管免疫からみた有効性を検討し、*B.breve*、*L.reuteri*、*L.brevis* の消化管粘膜における免疫応答やその応答に影響を及ぼす要因などを検討することを目的に本研究の計画に至った。本検討により、Treg 細胞や Th17 細胞、および関連サイトカインや誘導細菌を介したプロバイオティクスの低出生体重児における消化管免疫応答への影響を検証していく。

3. 研究の方法

(1) Caco-2 細胞を用いたプロバイオティクスの付着能の検討

・ヒト腸管上皮由来 Caco-2 細胞を単層培養し、 1×10^8 CFU/ml となるように調整した *B.breve*、*L.reuteri*、*L.brevis* をそれぞれ培養液に添加する。37℃ で 1 時間培養を行ったのち、各菌を PBS で静かに洗い流し、付着した菌をメタノールで固定したのちメチレンブルーで染色を行う。

・Caco-2 細胞 10 個当たりの付着した各菌数を顕微鏡にて数え付着能を検討する (Matsuo, et al.

(2) 新生仔マウスにおけるプロバイオティクスの消化管免疫応答への影響

・ddY 妊娠マウスを用い、生後 2 日目から新生仔マウスに *B.breve*、*L.reuteri*、*L.brevis* をそれぞれ 1×10^8 CFU/ml に調整し、ポリエチレンチューブを用いて胃内に 0.1ml を 5 日間連続で注入する。

・生後 1、2、4 週目にマウスをエーテル麻酔し脱血後消化管を抽出し、胃、小腸、盲腸、大腸に分け、小腸はさらに上部、中部、下部に分けて、ホモジェナイズした後の各消化管粘膜を凍結保存する。

・採取した胃、小腸上部・中部・下部、盲腸、大腸の各粘膜から mRNA を抽出し、cDNA を作成したのち、Treg 細胞および Th17 細胞ならびに関連サイトカインの遺伝子発現を R-T PCR 法を用いて確認し、さらに Western blot 法にて蛋白量を定量して各プロバイオティクス間で比較検討を行う (Ohtsuka, Shimizu, et al. *Pediatr Res* 71:46-53,2012)。

・また腹部大動脈より採血を行い、炎症性関連サイトカインである IL-6、TNF- α 、Th1 関連サイトカインである IFN- γ 、Th2 サイトカインである IL-4、Treg サイトカインである TGF- β 、IL-10、Th17 サイトカインである IL-17、IL-22、IL-23 の測定をそれぞれマルチプレックスアッセイシステムあるいは ELISA kit を用いて行う。

(3) 極低出生体重児におけるプロバイオティクスの消化管免疫応答への影響の検討

・順天堂大学附属順天堂医院 NICU に入院した出生体重 1500g 未満の極低出生体重児をインフォームドコンセントを取得した後に対象とし、現在行っている出生日からの *B.breve* (10^8 CFU/日) 投与に加え、生後 1 週目からの *L.reuteri* (10^8 CFU/日) 同時投与群、*L.brevis* (10^8 CFU/日) 同時投与群、および *B.breve* のみの投与群の 3 群に分けて検討を行う。

・各群における腸管感染症、敗血症、NEC、アレルギー症状などの臨床症状と糞便中短鎖脂肪酸や sIgA 値、血中サイトカイン値および糞便中細菌分析の結果との関係を検討する。糞便中短鎖脂肪酸分析は HPLC にて行い (Wang, Shimizu, et al. *J Pediatr Gastroenterol*

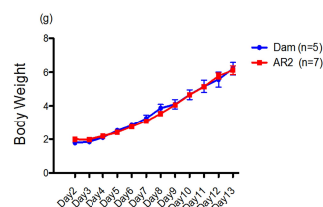
Nutr 44:252-7,2007) 便中細菌叢の分析は定量的 R-T PCR 法にて実施し、便中 sIgA は sIgA キットを用いて行い、血中サイトカインの測定はマルチプレックスアッセイシステムおよび各種 ELISA kit を用いて行う。

・臨床症状は、NICU 退院後も修正 12 か月まで継続して観察し、糞便中短鎖脂肪酸分析および細菌分析と合せ、修正 3、6、9、12 か月時に評価する。

4. 研究成果

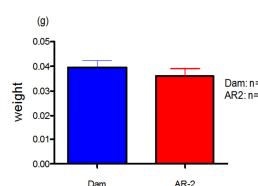
(1) 本研究で使用する 3 種のプロバイオティクスである *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium breve* の菌数の調整を行い、次に *L.reuteri* および *L.brevis* は好氣的に、*B.breve* は嫌氣的に MRS 培地に培養条件を確認後増殖培養を行った。続いて、Caco-2 細胞の培養条件を検討し、ストック保存と安定増殖培養を確認した。さらに Caco-2 単層細胞培養を膜の抵抗値を測定することにより確認した。

(2) 新生仔マウスを母乳群 (Dam 群) と日齢 2 より人工哺育する群 (AR-2 群) に分けた (図 1, 2)。両群マウスとも日齢 14 に解剖し、胸腺、脾臓、小腸における免疫担当細胞の数や細胞組成の変化についてフローサイトメトリーを用いて解析し、比較を行った。自然免疫細胞については AR-2 群において T 細胞、iNK 細胞、NK 細胞、樹状細胞、マクロファージ、顆粒球が脾臓、腸管でいずれも増加を示した (図 3)。獲得免疫細胞については、脾臓、腸管、胸腺で CD8+T 細胞が AR-2 群において増加した (図 4)。人工乳群において自然免疫細胞や CD8+T 細胞が母乳群に比較して腸管のみならず全身性に活性化されていた。



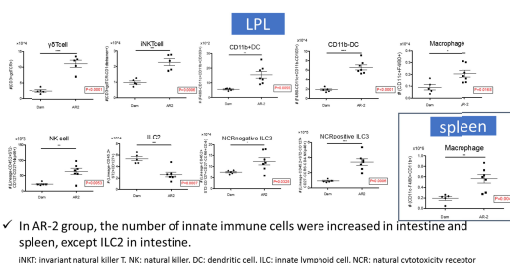
✓ There was no difference in the body weight between Dam and AR-2 mice.

図 1 Body weight gain in Dam and AR-2 mice



✓ There was no difference in thymus weight between Dam and AR-2 mice.

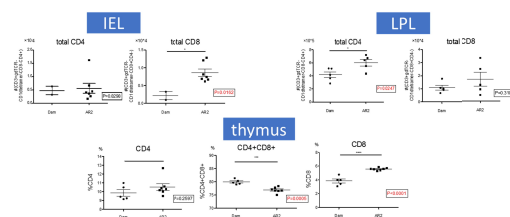
図 2 Thymus weight in Dam and AR-2 mice



✓ In AR-2 group, the number of innate immune cells were increased in intestine and spleen, except ILC2 in intestine.

INK1: invariant natural killer 1, NK: natural killer, DC: dendritic cell, ILC: innate lymphoid cell, NCR: natural cytotoxicity receptor

図 3 Innate immune system



✓ In AR-2 group, the number of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were increased in intestine and thymus.

✓ In AR-2 group, the number of CD4⁺CD8⁺ T cells was decreased in thymus.

図 4 Acquired immune system

表 1 Probiotics を投与した早産児の退院後の腸内細菌叢

対象：1500g未満
除外：院外出生、外科疾患(動脈管閉存症除く)、染色体異常

M-16V群： 順天堂大学医学部順天堂医院NICU
⇒ピフィズ菌M-16V(*B.breve*: 10^9 cfu/1.2g/包；規格値)1日1包
⇒経腸栄養開始時(生後約6時間後)より経口摂取確立まで

Control群： 順天堂大学医学部浦安病院NICU
⇒ピフィズ菌投与なし

退院後1か月および1年後に便を採取。
⇒腸内細菌叢：パイロシーケンス法

	M-16V群 (n=10)	Control群 (n=9)
在胎週数(w)	31.7 (± 3.6)	30.3 (± 2.4)
出生体重(g)	1404 (± 266)	1096 (± 255)
採便時体重(g)	4311 (± 910)	3501 (± 382)
採便時修正週数(w)	46.1 (± 2.5)	43.8 (± 6.3)

(± SD)

(3) 低出生体重児へのプロバイオティクス投与の有用性につき検討するにあたり、生後早期の *B.breve* 投与のその後の腸内細菌叢への影響を調査した(表)1)。日齢0からの *B.breve*(M-16V) 投与により1か月と1歳のサンプルから M-16V と思われる産物が検出されたが、一部のサンプルから菌株を分離したところ、1か月糞便サンプルからのみ M-16V と思われる株が確認された(図5)。また、特異的プライマーの再設計により、現行プライマーの特異性には問題が在ることが示されたため、新規プライマーにより再検討を行った結果、1か月のサンプルからのみ M-16V と思われる PCR 産物が検出された。

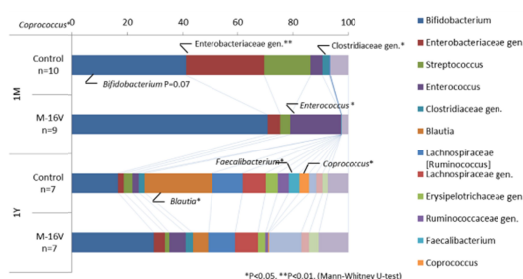


図5 Probiotics 投与による腸内細菌叢の変化

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 11 件)

- Inage E, Ohtsuka Y, Shimizu T, et al. Critical Roles for PU.1, GATA1, and GATA2 in the expression of human Fc RI on mast cells: PU.1 and GATA1 transactivate FCER1A, and GATA2 transactivates FCER1A and MS4A2. *J Immunol* 192:3936-46,2014
- Suganuma H, Shoji H, Shimizu T, et al. Fat emulsion given to very-low-birth-weight infants increases urinary L-FABP. *Pediatr Int* 56:207-10,2014
- Matsunaga N, Shimizu T, et al. An investigation into the vancomycin concentration in the cerebrospinal fluid due to vancomycin intraventricular administration in newborns: a study of 13 cases. *Medicine* 94:e922,2015
- Yamazaki S, Ohtsuka Y, Shimizu T, et al. The Transcription Factor Ehf Is Involved in TGF-β-Induced Suppression of Fc RI and c-Kit Expression and Fc RI-Mediated Activation in Mast Cells. *J Immunol* 195:3427-35,2015
- Shoji H, Shimizu T, et al. Influence of gestational age on serum incretin levels in preterm infants. *J Dev Orig Health Dis* 7:685-8. 2016
- Ikeda N, Shoji H, Shimizu T, et al. Effect of insulin-like growth factor-I during the early postnatal period in intrauterine growth-restricted rats. *Pediatr Int* 58:353-8. 2016
- Shoji H, Shimizu T, et al. A pilot study of the effect of human breast milk on urinary metabolome analysis in infants. *J Pediatr Endocrinol Metab* 30:939-46,2017
- Honjo A, Ohtsuka Y, Shimizu T, et al. Pharmacologic inhibition of Notch signaling suppresses food antigen-induced mucosal mast cell hyperplasia. *J Allergy Clin Immunol* 139:987-96,2017
- 坂口慶太, 清水俊明. 小児の健康と腸内細菌叢 出生後の免疫発達と腸内細菌叢の形成の関わりについて. *小児科臨床* 70:607-6
- 佐藤真教, 清水俊明. 小児の下痢・便秘に対するプロバイオティクスのエビデンスと治療の位置づけ. *薬局* 68:55-59.2017

11. 東海林宏道, 清水俊明, 他. プロバイオティクスの使用方法. 周産期医学 47:987-990. 2017

[学会発表] (計 8 件)

1. 清水俊明. 小児領域におけるプロバイオティクスの有用性. 第 31 回神奈川県小児肝・消化器疾患研究会, 横浜. 2015.9.9
2. Shimizu T. Food sensitive enteropathy. 2015 annual National Conference of Chinese Pediatric Society, Xiamen, China. 2015.9.24
3. Baba Y, Ohtsuka Y, Shimizu T., et al. Antigen-specific IgA plays an important role in mucosal immune response in allergic children: Measurement of secretory IgA and antigen-specific IgA. The 23rd of the World Allergy Congress, Seoul, Korea. 2015.10.17
4. Hosoi K, Ohtsuka Y, Shimizu T., et al. Increased expression of interleukin-26 in the mucosa of pediatric inflammatory bowel disease. The 11th Congress of the Asian Society for Pediatric Research & the 118th Annual Meeting of the Japan Pediatric Society, Osaka, Japan. 2015.4.15
5. Yamazaki S, Ohtsuka Y, Shimizu T., et al. The transcription factor Ehf is involved in TGF- β -induced suppression of Fc RI and c-Kit expression and Fc RI-mediated activation in mast cells. 23rd of the World Allergy Congress, Seoul, Korea. 2015.10.15
6. Shimizu T. Food sensitive enteropathy. 2016 KSPGHAN Symposium, Seoul, Korea. 2016.11.11
7. Jimbo K, Ohtsuka Y, Shimizu T., et al. An analysis of gastrointestinal blood flow with

doppler ultrasonography in children with food protein-induced enteropathy. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Montreal, Canada. 2016.10.7

8. Baba Y, Ohtsuka Y, Shimizu T., et al. Measurement of antigen-specific IgA may be useful in children with food allergy. The 72nd Annual Meeting of American Academy of Allergy Asthma and Immunology, Los Angeles, CA, USA. 2016.3.6

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・清水俊明 (SHIMIZU, Toshiaki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 30260889

(2) 研究分担者

・大塚宜一 (OHTSUKA, Yoshikazu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 90338335

・東海林宏道 (SHOJI, Hiromichi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 30365621