

第64回日本小児保健協会学術集会 ミニシンポジウム2

小児疾患と腸内細菌

腸内細菌は宿主の健康と疾患感受性に密接に関係

山城 雄一郎 (順天堂大学大学院プロバイオティクス研究講座)

I. はじめに

食事—腸内細菌—宿主の代謝がヒトの健康と疾患感受性リスクを考慮するうえで極めて重要な要因となってきた。その背景の一つには、細菌の分析検索方法として永年使われてきた培養法に代わり、分子生物学的検索法である16s リボソーム DNA あるいは16s リボソーム RNA を用いた、即ち非培養依存法が登場したことにある。

本稿では、腸内細菌と食事内容が密接に関係し、発酵産生される有機酸が宿主の代謝、免疫機構に与える影響や近年注目されてきた胆汁酸の役割について、筆者らの研究グループのデータおよび文献的データを考察し、総論的に述べる。

II. 腸内細菌

1. 腸内細菌の概要

成人の腸管内には人体の菌の70%以上が生着し、約1,000種、100兆個の細菌が宿主と利益を共有して共生していて、その大部分は結腸に繁茂している。腸内細菌は、栄養やエネルギーの供給促進、病原菌の腸内増殖とその定着の防止そして正常な腸管免疫の維持、促進に重要な役割を担っている。腸内細菌構成菌（叢）の変動は分子シグナルを介して宿主の代謝や免疫など生理、生化学的機能に影響し、健康と疾病の感受性リスクそして疾病の発症に密接に関係する。

2. 子宮内に菌が存在—胎児の腸管にも菌が存在—

分子生物学的手法である16s リボソーム DNA を用いた胎盤の細菌学的検索により、胎盤に菌が常在し、臍帯血、羊水、胎児膜そして胎便¹⁾からも細菌が検出されている。

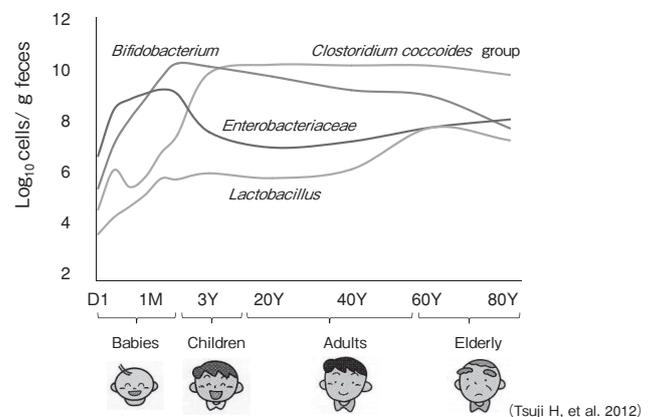


図1 腸内細菌は乳児期から老年期まで生涯を通じて変化する

III. 健常児の腸内細菌 (図1)

1. 新生児期

胎児期の腸管内に生きた細菌の存在が確認されているが、児が種々の細菌獲得源から広範囲で多様な細菌群に曝露されるのは、出産時である。成熟新生児の糞便中に最初に出現するのは、通性嫌気性菌の *Enterobacteriaceae*, *Enterococci*, *Staphylococci*, *Lactobacillus* などであるが、1週間前後で急速に偏性嫌気性菌の *Bifidobacterium*, *Bacteroidetes* が出現して優位を占めるようになる¹⁾。共同研究者の Rahman ら²⁾によると *Lactobacillus* は産道通過時に母体の膣から、*Bifidobacterium* は肛門付近 (便由来) から獲得する可能性が高い。生後1週間以内には偏性嫌気性優位の種々の菌から成る腸内細菌が定着する。

2. 乳児期

共同研究者の Tsuji ら¹⁾によると、母乳栄養児では生後3か月頃までに *Bifidobacterium* 優位の菌叢に

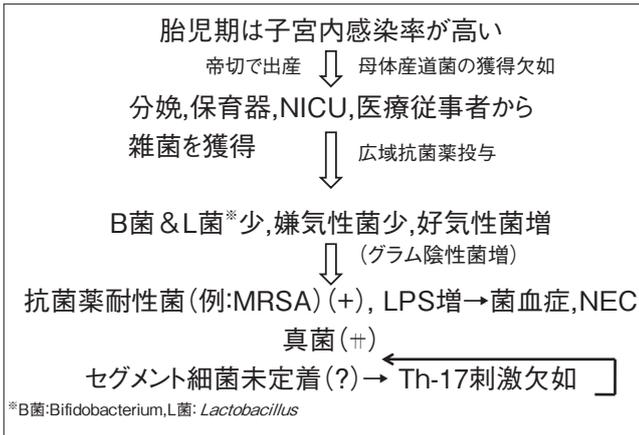


図2 未熟児の腸内細菌叢の特徴 (dysbiosis)

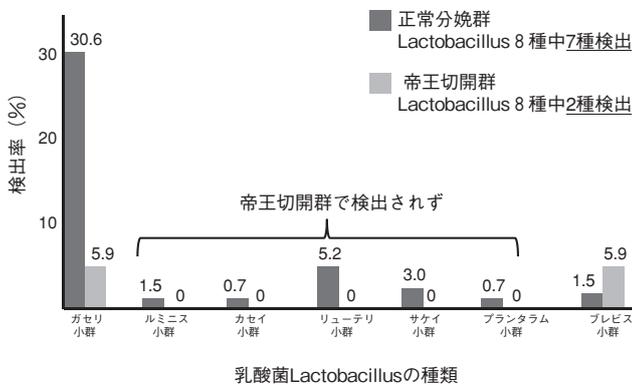


図3 Lactobacillus の胎便からの検出頻度と検出率

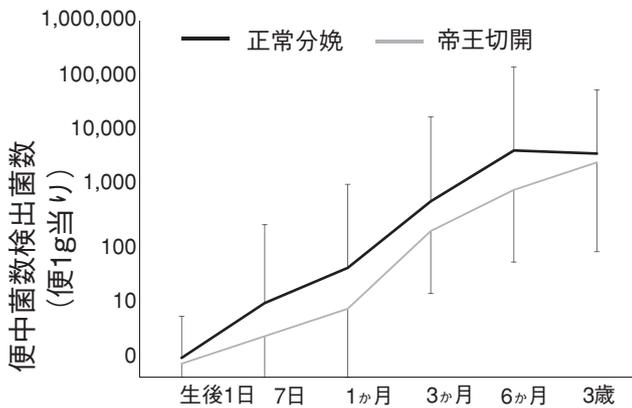


図4 正常分娩と帝王切開分娩児の便中 Bifidobacterium 数の生後から3歳までの推移

なり、生後6か月頃ピークに達して腸内細菌構成の95%以上を占める。その後は離乳食の導入により、*E.coli*, *Streptococci* そして *Clostridium* の細胞数が増加し *Bacteroides* や嫌気性のグラム陽性菌も増えてきて、母乳栄養児と人工栄養児の菌の構成の違いは次第に少なくなる。

3. 学童期前期および学童期

共同研究者の Wang ら³⁾によると4~12歳では、*Bifidobacterium* は乳幼児期以降から減少傾向にあるも優勢な菌であり続け、他の偏性嫌気性菌である *Bacteroides*, *Clostridium* そして通性嫌気性の *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* などが徐々に増加傾向を示す。しかしこれらの菌数は8~9歳頃から平坦化し思春期そして成人期に移行する。

IV. 未熟児, 帝切児の腸内細菌

1. 未熟児の腸内細菌の特徴

未熟児は種々の理由から帝切により娩出、NICUに收容されることが多い。NICUに收容された未熟児は、分娩室、手術室そして保育器内の環境の菌に曝露され、最初に腸内細菌として定着するのは、*Klebsiella* や *Enterobacter* 種で、*E.coli* を凌いで優性である。また抗菌薬が投与される頻度が高く、腸内細菌構成の異常 (dysbiosis) を認める (図2)。

2. 未熟児の腸上皮細胞の特徴

種々の未熟性に基づく異常があり、グラム陰性菌が増加する結果、その壁成分で内毒素である lipopolysaccharide (LPS) が腸管内に増加する。LPSは腸粘膜を障害し腸透過性が亢進する結果、LPSが血中に侵入し macrophage などの免疫細胞を刺激してサイトカインなどが分泌され炎症を生じる。腸透過性亢進は腸内細菌の bacterial translocation を併発し、菌血症、さらには敗血症を惹起する。血中のLPSは脳内へも移行し、未熟児脳病変特有の periventricular leukomalacia を含む white matter injury をも発症するリスクを高める。

3. 帝切児の腸内細菌構成は異常

帝切児は産道を通らないため、有益菌の代表である *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* などを母体から獲得する機会を逸し、母親の皮膚や分娩時、処置の際に医療従事者から菌を獲得する可能性が高い。共同研究者の Nagpal らが検索した胎便からの *Lactobacillus* の検出頻度と検出率のデータを図3に示した⁴⁾。また、帝切児の出生後の腸内細菌は多様性に欠け *Bifidobacterium* 細胞数は経膈分娩のそれに比し、生後7日、1か月そして生後6か月時まで有意に低値であった (図4)⁵⁾。

われわれは更に、毒性を有する *Clostridium perfringens* の有無を詳細に検討した結果、生後6か月時点で帝切児の保有率は経膈分娩児に比し有意に高値であった⁶⁾。また帝切で出生した19歳前後の若年成人の腸内細菌も依然として異常を呈していることを世界で初めて示した⁷⁾。

4. 帝切児の腸内細菌構成異常が児の健康に影響し発病リスクが高まる疾患

母体由来（膈、糞便）の菌は新生児、乳児の腸管そして全身免疫の成熟に重要な役割を演じている。これを反映し、帝切児にメタボリック症候群や免疫関連疾患の発症頻度が高いとする報告が近年になって増えてきた。例えば肥満⁸⁾、アレルギー性鼻炎や喘息⁹⁾、I型糖尿病¹⁰⁾、炎症性腸疾患¹¹⁾、自閉症¹²⁾などで、帝切児の腸内細菌構成の異常と密接に関係する慢性炎症や免疫能の発達の異常の関与が示唆されている。

V. 腸内細菌構成に良い影響を与える母乳栄養

1. 新生児、早期乳児の腸内細菌構成に影響する因子

新生児、早期乳児の腸内細菌構成に影響を与える因子を表1に示した。これら因子の中、分娩方法に関しては、帝切の影響が大きく、在胎週数では未熟児の腸内細菌の特徴を前述した。当項では乳児の栄養法、特に母乳栄養の利点、重要性について述べる。

2. 母乳栄養の特徴—乳児の健康的な成長、発育に最適な腸内細菌構成を促進—

母乳栄養の特徴を簡単にまとめると、①成長発育が緩やかで、②感染症、アレルギー疾患、肥満、メタボリック症候群（生活習慣病）が少ない。栄養分の特徴としては、①低タンパク質、②脂質としてドコサヘキサエン酸（DHA）、オレイン酸が多い、③特有のオリゴ糖を含むなどが挙げられる。

1) 母乳中のタンパク質

1. 母乳栄養児に肥満、メタボリック症候群が少ない理由の一つはその低タンパク質にある。

表1 新生児、早期乳児の腸内細菌叢構成に影響する因子

- | |
|-------------|
| 1. 分娩方法 |
| 2. 乳児の栄養法 |
| 3. 在胎週数 |
| 4. 児の入院の有無 |
| 5. 抗菌薬投与の有無 |

母乳栄養児は人工栄養児に比して肥満が少ないことが知られている。

高タンパク質食（人工乳、離乳食）を摂取した乳児の血中では、分枝鎖アミノ酸のバリン、ロイシン、イソロイシンが増加する。ロイシンは強力なインスリン分泌刺激作用があり、その後の連鎖反応で、成長ホルモン分泌→インスリン様成長因子-1（IGF-1）が生成され、前脂肪細胞（preadipocyte）から成熟脂肪細胞（mature adipocyte）へ分化する後期の段階にIGF-1が作用してこれを促進する。脂肪細胞分化と乳幼児期の高タンパク質が惹起するIGF-1分泌の亢進は、その児の将来の肥満、メタボリック症候群のリスクを推察するうえで重要である。

2. 人工乳のタンパク質濃度は1.6g/100kcalが望ましい：小児の肥満、生活習慣病対策に重要な示唆。

最近欧米では人工乳中タンパク質含有量1.6g/100kcalの減量化が試みられ、母乳栄養児との比較で、生後5歳までの体重、身長、頭囲そして血清IGF-1に有意差を認めなかったと報告されている¹³⁾。

2) 母乳中の脂質

乳児の最大のエネルギー源は脂質で、その必要エネルギーの40~55%を供給している。エネルギー以外に必須微量栄養分を乳児に供給し、また消化管機能、脂質およびリポタンパク質代謝、神経機能そして免疫機能を支援する重要な役割を有する母乳中には多価不飽和脂肪酸のDHA（n-3系 C22:6n-3）、アラキドン酸（AA, n-6系: C20:4n-6）、単価不飽和脂肪酸のオレイン酸（C19:1n-9）そして少量ながら脂溶性ビタミンA, D, E, Kなどを含む。これら脂肪は授乳児の抗感染、抗炎症作用や免疫反応の機能増強、神経学的発達、心血管機能そして腸内細菌（例：*bifidobacteria*, *lactobacillus*）の増殖などに関係する。

3) 母乳中の不飽和脂肪酸と脂肪細胞—不飽和脂肪酸による脂肪細胞過剰形成の抑制と炎症性サイトカイン分泌抑制—

乳児期に高タンパク質、高エネルギーの人工乳を含む乳・幼児食は前述のように、脂肪細胞数が増加する。小児期後は、同様な食事を与えても脂肪細胞数はあまり増加せず、脂肪細胞のサイズが大型化した大型脂肪細胞となり、レプチン、アディポネクチンそして種々のサイトカインを分泌する内分泌細胞化する。小児期後、成人の肥満の脂肪組織はこのような内分泌化した大型脂肪細胞から成り、乳幼児肥満の小型（正常な）

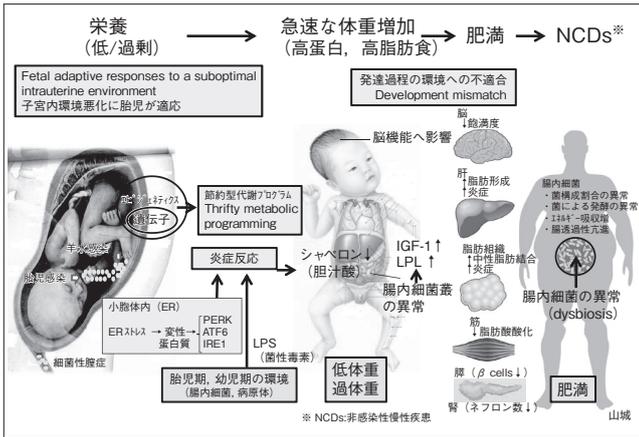


図5 DOHaD—生命誕生早期の環境要因がメタボの原因—

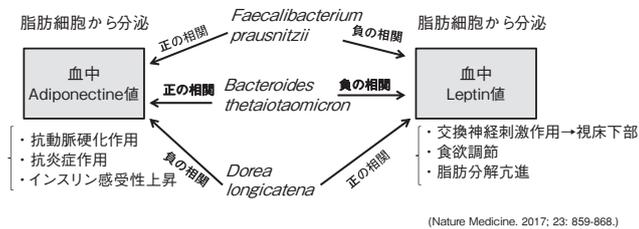


図6 腸内細菌

脂肪細胞から成るそれと性格を異にする。大型脂肪細胞が主体の肥満細胞組織では、マクロファージなどの免疫細胞が炎症性サイトカインの分泌を刺激、高エネルギー、高飽和脂肪酸、高アラキドン酸 (AA) の含有食事が続くと、持続する(慢性)軽度炎症状態となり、インスリン抵抗性を生じ、メタボリック症候群の高リスク状態となる。DHA, エイコサペンタエン酸(EPA) のn-3系不飽和脂肪酸は炎症性サイトカイン分泌を抑制し、逆に飽和脂肪酸は分泌を刺激する¹⁴⁾。

4) 母乳オリゴ糖 (human milk oligosaccharides : HMOs)

HMOs は、母乳中の主要成分で病原菌感染から乳児を予防し *bifidobacteria* を含む *Bacteroides* などの母乳栄養児特有の腸内細菌を増加、促進、腸管機能の発達刺激、そして免疫能の成熟刺激作用などがある¹⁵⁾。

3. 小児期の腸内細菌構成の異常に伴う健康傷害

1) DOHaD 理論上、腸内細菌構成異常は重要因子の一つ

Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) を単純に説明すると“生活習慣病の病因は胎児期から幼児期に至る1,000日間の栄養と環境に由来する”と言える。その環境要因の重要な一つが異常な腸内細菌構成である (図5)¹⁶⁾。

2) 腸内細菌構成異常が健康へ及ぼす影響

・肥満、生活習慣病と腸内細菌

肥満を生じる高脂肪 (高飽和脂肪酸)・高カロリー食は、腸内細菌の *bacteroidetes* の減少と *firmicutes* の増加を起し細菌構成のバランスを崩す。また、多糖類分解酵素を有する菌を増やし、エネルギー産生やその抽出能の高い菌も多く、肥満を促進する。即ち、肥満、2型糖尿病等の生活習慣病は、(大型化した)肥満細胞から炎症性 cytokines が分泌され慢性持続性の炎症となり、高 leptin を伴う炎症を呈し、インスリン抵抗性の状態となる。最近の報告で成人肥満では、*Bacteroides thetaiotaomicron* (代表的な *bacteroidetes*) と *F.prausnitzii* が adipocytokine の血中 leptin 値と負の相関、adiponectin と正の相関を、*D.longicatena* がこれらの関係と逆の相関を示したという (図6)。肥満者の腸内にはグラム陰性菌も多く毒素リポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) が多く産生され炎症の主原因となる。小児の肥満でも成人同様の腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) が存在することを、共同研究者の永田らが明らかにした。共同研究者の佐藤らは2型糖尿病患者 (成人) では、腸内細菌の異常が認められた (日本人糖尿病患者では初めて報告) だけでなく、腸管内高 LPS 濃度が腸管バリア機能を損傷し、腸管透過性亢進 (bacterial translocation) により患者の約3割に菌血症 (bacteremia) を呈していることを世界で初めて報告した¹⁷⁾。

VI. 腸内細菌と食物の相互作用が宿主の代謝に影響—腸内細菌が宿主へシグナル伝達する機序—

腸内細菌による発酵作用で食物繊維から産生された SCFs は、エネルギーを大腸細胞だけでなく宿主全体の6~10%のエネルギーを供給する。SCFs は宿主に対し少なくとも4経路を通じてシグナル伝達している。第一に酪酸 butyrate は大腸細胞へエネルギーを供給し、小腸運動を緩やかにして栄養吸収を促進するとともにインスリン感受性を高める。また、制御性 T 細胞 Treg cells 分化促進作用も有する。

第二に、プロピオン酸塩 propionate は腸管における糖新生を誘発し脳神経を介したシグナルで、食事性の肥満と糖不耐からの保護作用を発揮する。第三は、酪酸と酢酸はともにヒストン脱アセチル化酵素の障害物質 histone deacetylases inhibitors として作用し、第四は SCFAs が G 蛋白連絡受容体 G-protein-coupled

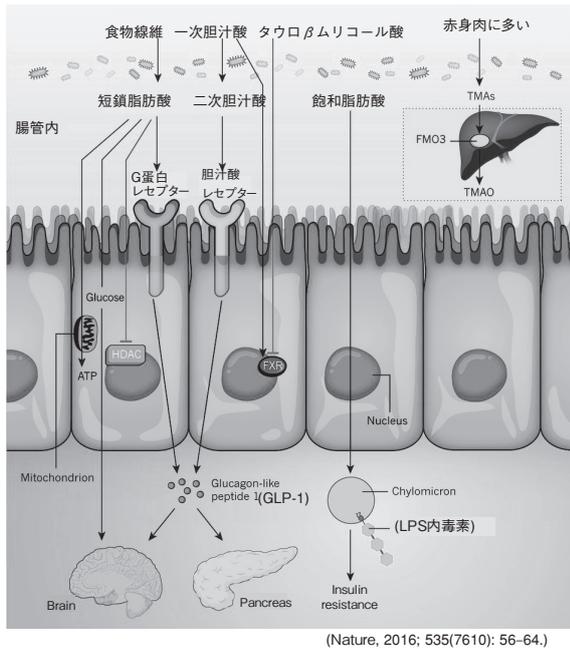
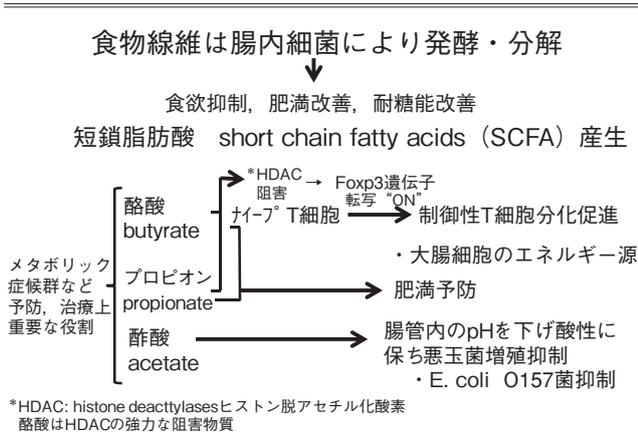


図7 宿主—腸内細菌の代謝シグナル機序 主に4経路から伝達

表2 食物繊維は身体機能に多様な有益効果を発揮



受容体の GPR41 および GPR43 を介しての腸内分泌系への関与で、これら GPR41 と 43 がグルカゴン様ペプチド 1, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), 即ちインクレチンの分泌を誘発する (図 7, 表 2)。他方、一次胆汁酸 cholic acid (CA), chenodeoxy cholic acid (CDCA) は $7\alpha/7\beta$ hydroxylase を保有する腸内細菌により下部小腸から結腸で二次胆汁酸 deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA) に変化する。二次胆汁酸は胆汁酸受容体の TGR 5 および FXR を介して、それぞれ GLP-1 分泌刺激で糖代謝の改善, 肥満および脂肪肝の改善をもたらす (表 3)。

表 3 二次胆汁酸 (DCA, LCA) と宿主の病態生理学関連—腸内細菌は胆汁酸を介して細胞および宿主の生理, 代謝機能に変化を与える—

二次胆汁酸が刺激する
Nuclear receptors / G-protein coupled receptors
Farnesoid X Receptor (FXR) : インスリン転写, 分泌調節 膵 β 細胞に発現
Pregnane-activated Receptor (PXR)
Vitamin D Receptor (VDR)
TGR-5 (GD-BAR 1) : L 細胞から GLP-1 と PYY を分泌 腸内分泌細胞 (L 細胞) 上に発現
Sphingosine-1 Phosphate Receptor 2 (S1 PR2)
Muscarinic Receptors (M2, 3)

VII. 腸内細菌構成異常への対策は重要

腸内細菌の異常が肥満, 生活習慣病の発症に深く関与することが明らかになった現在, 腸内細菌異常対策として, まず予防的観点からその要因である帝切, 食事 (高飽和脂肪酸食, 高タンパク質, 高エネルギー食), 抗生物質の過度の使用, そして妊婦肥満をできるだけ減少させる対策が必要である。確立した腸内細菌の異常 dysbiosis に対してはその是正, 治療として probiotics, prebiotics あるいはその併用 (synbiotics) が有力な候補になると考える。筆者らのグループは, 2 型糖尿病患者 (成人) に対し probiotics を投与して, その腸内細菌構成と菌血症 (前述) の改善したことを, 世界で初めて証明した¹⁸⁾。

また筆者らは, 未熟児に対して出生直後から *B. breve* を経鼻胃チューブを介して連日投与を行い, 敗血症や壊死性腸炎の発症を有意に減少させることを報告している¹⁹⁾。

そして, 肥満児に対しては *Lactobacillus casei shirota* を投与した介入試験を行い, その腸内細菌異常と肥満度の改善を認めた²⁰⁾。

VIII. おわりに

食事—腸内細菌—宿主の代謝が密接な相互作用を有し, 宿主の健康と疾患発症リスクに関与することを, 筆者らの研究グループのデータと文献的データをもとに考案し, 更に小児においては DOHaD 理論上, 胎児期そして乳幼児期に形成されその生涯に影響する腸内細菌構成の重要性を述べた。

文 献

- 1) Tsuji H, Oozeer R, Matsuda K, Matsuki T, Ohta T, Nomoto K, Tanaka R, Kawashima M, Kawashima K, Nagata S, Yamashiro Y. Molecular monitoring of the development of intestinal microbiota in Japanese infants. *Benef Microbes* 2012 ; 3 (2) : 113-125.
- 2) Rahman SMd, Nagata S, Matsuda K, Tsuji H, Ogata K, Ozaki S, Kawashima K, Nomoto K, Yamashiro Y. Molecular biological studies of the origin of neonatal fecal Bifidobacterium and Lactobacillus in neonatal feces. *Int J of Probiotics Prebiotics* 2012 ; 7 : 91-98.
- 3) Wang C, Nagata S, Asahara T, Yuki N, Matsuda K, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Yamashiro Y. Intestinal Microbiota Profile of Healthy Pre and School Age Children and Effects of Probiotic Supplementation. *Ann Nutr Metab* 2015 ; 67 (4) : 257-266.
- 4) Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Kawashima K, Nagata S, Yamashiro Y. Ontogenesis of the Gut Microbiota Composition in Healthy, Full-Term, Vaginally Born and Breast-Fed Infants over the First 3 Years of Life : A Quantitative Bird's-Eye View. *Front Microbiol* 2017 ; 8 : 1388.
- 5) Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, Nomoto K, Yamashiro Y. Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term Infants Born Vaginally or by Cesarean Section. *Front Microbiol* 2016 ; 7 : 1997.
- 6) Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Kawashima K, Nagata S, Yamashiro Y. Gut dysbiosis following C-section instigates higher colonization of toxigenic Clostridium perfringens in infants. *Beneficial Microbes* 2017 ; 8 (3) : 353-365.
- 7) Suzuki Y, Ikeda K, Sakuma K, Kawai S, Sawaki K, Asahara T, Takahashi T, Tsuji H, Nomoto K, Nagpal R, Wang C, Nagata S, Yamashiro Y. Association Between Yoghurt Consumption and Intestinal Microbiota in Healthy Young Adults Differs by Host Gender. *Front Microbiol* 2017 ; 8 : 847.
- 8) Huh SY, Rifas-Shiman SL, Zera CA, Edwards JW, Oken E, Weiss ST, Gillman MW. Delivery by caesarean section and risk of obesity in preschool age children : a prospective cohort study. *Arch Dis Child* 2012 ; 97 (7) : 610-616.
- 9) Renz-Polster H, David MR, Buist AS, Vollmer WM, O'Connor EA, Frazier EA, Wall MA. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy* 2005 ; 35 (11) : 1466-1472.
- 10) Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre MJ, Parslow RC, Pozzilli P, Brigis G, Stoyanov D, Urbonaite B, Sipetić S, Schober E, Ionescu-Tirgoviste C, Devoti G, de Beaufort CE, Buschard K, Patterson CC. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus : a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* 2008 ; 51 (5) : 726-735.
- 11) Bager P, Simonsen J, Nielsen NM, Frisch M. Cesarean section and offspring's risk of inflammatory bowel disease : a national cohort study. *Inflamm Bowel Dis* 2012 ; 18 (5) : 857-862.
- 12) Buie T. Potential Etiologic Factors of Microbiome Disruption in Autism. *Clin Ther* 2015 ; 37 (5) : 976-983.
- 13) Tanaka H, Ishii H, Yamada T, Akazawa K, Nagata S, Yamashiro Y. Growth of Japanese breastfed infants compared to national references and World Health Organization growth standards. *Acta Paediatr* 2013 ; 102 (7) : 739-743.
- 14) Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of health and disease : an overview. in *Developmental Origins of Health and Disease* (ed. Gluckman P, Hanson M). Cambridge University Press, 2006 : 1-5.
- 15) Bode L. Human milk oligosaccharides : every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 2012 ; 22 (9) : 1147-1162.
- 16) Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abe H, Komiya K, Kawaguchi M, Shimizu T, Ogihara T, Tamura Y, Sakurai Y, Yamamoto R, Mita T, Fujitani Y, Fukuda H, Nomoto K, Takahashi T, Asahara T, Hirose T, Nagata S, Yamashiro Y, Watada H. Gut dysbiosis and detection

- of “live gut bacteria” in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37 (8) : 2343-2350.
- 17) Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Kawashima K, Nagata S, Yamashiro Y. Gut dysbiosis following C-section instigates higher colonisation of toxigenic *Clostridium perfringens* in infants. *Benef Microbes* 2017; 8 (3) : 353-365.
- 18) Sato J, Kanazawa A, Azuma K, Ikeda F, Goto H, Komiya K, Kanno R, Tamura Y, Asahara T, Takahashi T, Nomoto K, Yamashiro Y, Watada. Probiotic reduces bacterial translocation in type 2 diabetes mellitus : A randomised controlled study. *Sci Rep* 2017; 7 (1) : 12115.
- 19) Yamashiro Y, Nagata S. Beneficial microbes for premature infants, and children with malignancy undergoing chemotherapy. *Benef Microbes* 2010; 1 (4) : 357-365.
- 20) 永田 智, 千葉幸英, 山城雄一郎, 朝原 崇, 野本康二. プロバイオティクスによる小児肥満対策に関する検討. 第12回日本小児栄養研究会, 栃木. 2015. 3. 14.