

Bifidobacterium 菌株の母子間伝播について

布山裕一^{1, 2} 外岡俊樹³ 和田靖之²
久保政勝² 井田博幸⁴

¹ 松戸市立病院新生児科

² 東京慈恵会医科大学附属柏病院小児科

³ 和光堂株式会社

⁴ 東京慈恵会医科大学小児科学講座

(受付 平成 24 年 11 月 9 日)

TRANSMISSION OF *BIFIDOBACTERIAL* STRAINS FROM MOTHER TO NEONATE

Yuichi FUYAMA^{1, 2}, Toshiki TONOOKA³, Yasuyuki WADA²
Masakatsu KUBO², and Hiroyuki IDA⁴

¹Department of Neonatology, The Matsudo City Hospital

²Department of Pediatrics, The Jikei University Kashiwa Hospital

³Wakodo Co., Ltd

⁴Department of Pediatrics, The Jikei University School of Medicine

To clarify the acquisition of the predominant *Bifidobacterium* strains in intestinal microbiota during infancy, we have examined the transmission between mother and child, focusing on the feces and breast milk of the mother. Because random amplification of polymorphic DNA showed that *Bifidobacterium* strains isolated from the feces of mother and child matched, we concluded that transmission occurred between mother and child. On the other hand, that *Bifidobacterium* strains were not isolated from breast milk suggests that intake of breast milk is not related to the acquisition of *Bifidobacterium* strains in the neonatal period. However, we recognize that transmission of bifidobacterial strains occurs. We conclude that administration of probiotics to pregnant women contributes to the acquisition of *Bifidobacterium* strains in the neonatal period.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2013;128:63-71)

Key words: transmission between mother and child, *Bifidobacterium*, intestinal microbiota, breast milk, random amplified polymorphic DNA method

I. 緒 言

我々は、経膣頭位分娩で出産した児を対象に、2歳までの腸内細菌叢の縦断的動態に関する研究を行い、2歳まで有用菌である*Bifidobacterium*が優勢であり、2歳の時点でも乳児期に検出率の高い*B. breve*が全被験者から検出されたことから¹⁾、

Bacteroidaceaeが優勢で²⁾、*B. catenulatum* groupの検出率が高い成人の腸内細菌叢³⁾とは異なっていることを明らかにした。新生児が獲得する細菌は、①出産時に母親の産道や肛門から伝播する、②出生後の空气中・衣類・寝具・食器等から伝播する、③母親の乳房の細菌が母乳を摂取する際に伝播するなどの諸説²⁾があるものの、*Bifidobacterium*が

どのように獲得されるかについては明らかではない。

今回、我々はまず、母子の糞便中の *Bifidobacterium* の菌種・菌株を抽出し、母子間伝播が認められるのかどうかを検討した。つぎに母乳中の *Bifidobacterium* の検出を試みることにより、母乳から児への *Bifidobacterium* 母子間伝播の可能性があるのかどうかを検索した。これらの研究により新生児の腸内細菌叢の獲得様式について知見を得たので報告する。

II. 対象と方法

1. 被験者

被験者は、2007年9月から2010年1月までに、東京慈恵会医科大学附属柏病院で出産した母親とその児の35組である。いずれの新生児も出生体重2,000 g以上であり全身状態良好のため産科病棟新生児室にて管理され、通常に哺乳を開始され抗生剤投与等の加療を要しなかった。被験者を母子糞便 *Bifidobacterium* 伝播試験を行う GroupA 5組と母乳からの *Bifidobacterium* 伝播試験を施行する GroupB 30組に分けた。4日齢の時点で母乳育児であった pair を breast feeding, 母乳と人工乳の混合であった pair を mixed feeding, 母乳による授乳はわずかである人工乳による育児であった pair を almost bottle feeding とした。今回の被験者の性別・年齢・分娩様式・哺乳様式を Table 1 に示す。GroupA の5組は全例経膈頭位分娩であった。被験者には、事前に本研究の目的と意義、試験方法および安全性について説明を行い、書面による同意を得た。本研究は、「ヘルシンキ宣言」ならびに「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して行った。本試験は、東京慈恵会医科大学の倫理委員会の承認を得て行われた。

2. 母子糞便での *Bifidobacterium* 伝播試験

この試験を行った GroupA での方法の概要を Fig. 1 に示す。5組の母子において出産後最初の母親の糞便とその母親から経膈頭位分娩で生まれた児で、4日齢の糞便を採取した。GroupA 5組を母子の糞便が採取できた順に pair1, pair2, pair3, pair4, pair5 とした。

始めに、糞便から直接DNAを抽出し、母子間

の *Bifidobacterium* 菌種分布の相同性を比較した。ヒトから分離される *Bifidobacterium* 8菌種と1群(2菌種は16 S rRNA 遺伝子の配列が類似するためプライマーが設計されていない)³⁾ をPCR法で検出した。ついで、*Bifidobacterium* 選択培地を用いて、糞便から菌株を分離した。*Bifidobacterium* 菌種の分布が母子間で一致した群においては、母子から分離された菌株で一致している菌種が同定されるか検討した。一方、*Bifidobacterium* 菌種の分布が母子間で一致しなかった群は、母親の糞便から検出された *Bifidobacterium* 菌種が、児から分離された菌株で同定されるかを検討した。同一菌種は、菌株特異性を確認するために、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法により Polymerase Chain Reaction (PCR) 産物の多型を比較した⁴⁾⁻⁶⁾。

1) 糞便からのDNA抽出

糞便は、緩衝液で洗浄後、溶菌酵素を用いて処理し、フェノール/クロロホルム法により、DNA抽出を行った。DNA溶液は試験に用いるまで、-20℃で保存した¹⁾。

2) 糞便からの *Bifidobacterium* 菌株の分離

糞便は、嫌気性希釈液A (KH₂PO₄, Na₂HPO₄, L-システイン塩酸塩, Tween80, 寒天) で10倍希釈系列を調製し、検液とした。非選択培地として Blood-liver (BL) 寒天培地 (日水製薬, 東京), *Bifidobacterium* 選択培地として TOS プロピオン酸寒天培地 (ヤクルト薬品工業, 東京) を用いて、培地上に塗布し、37℃で72時間、ガスバック法にて嫌気培養した。母親と児の糞便からの *Bifidobacterium* 菌株の分離は、pair3 の児を除き、TOS プロピオン酸寒天培地で高希釈率 (10⁶/g 以上) から分離し、純培養後に凍結保存した。Pair3 の児においては、10⁶/g 未満から *Bifidobacterium* 菌株が分離された。*Bifidobacterium* 菌株は、母親から50菌株、児から6から12菌株を分離した。その理由として、先の我々の報告で早期に児の糞便から分離された *Bifidobacterium* は、*Bifidobacterium* 菌種の多様性が少なかったので10菌株程度の分離とし、母親は早期の児よりも多様性が高いと考え50菌株を分離した。

3) 分離菌株からのDNA抽出

分離した *Bifidobacterium* 菌株は、UltraClean

Table 1. Characteristics of the subjects

Characteristics	Transmission test of bifidobacterial strains isolated from the feces of the mother and neonate pairs (GroupA)		Transmission test of bifidobacterial strains isolated from the breast milk and neonatal feces pairs (GroupB)	
	Health status of mother	Good	4	Good
	Graves' disease	1	Graves' disease	1
Neonate;				
Sex	Male	3	Male	14
	Female	2	Female	16
Age	4-day-old	5	4-day-old	28
	5-day-old	0	5-day-old	2
Birth weight	More than 2500g	5	More than 2500g	25
	Less than 2500g	0	Less than 2500g	5
Delivery method	Vaginal delivery	5	Vaginal delivery	15
	Cesarean section	0	Cesarean section	15
Feeding type	Breast feeding	1	Breast feeding	18
	Mixed feeding	3	Mixed feeding	7
	Almost bottle feeding	1	Almost bottle feeding	5

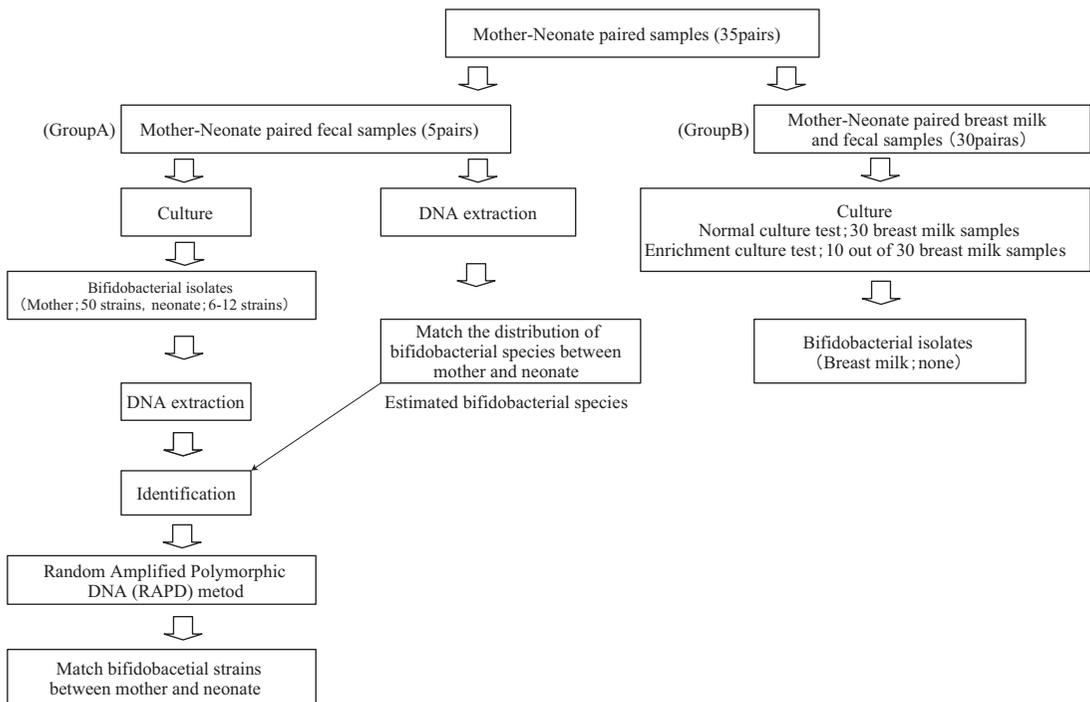


Fig. 1. Test procedure between the mother-to-child transmission

GroupA; Transmission test of bifidobacterial strains isolated from the feces of mother and neonate pairs

GroupB; Transmission test of bifidobacterial strains isolated from the breast milk and neonatal feces pairs

Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio Lab., Solana beach, CA) を用いて、DNA 抽出を行った。DNA 溶液は試験に用いるまで、 -20°C で保存した。

4) *Bifidobacterium* 菌種の検出および同定

Bifidobacterium 菌種分布の検出と分離菌株の同定は、松木ら³⁾ が作製したプライマーを用いて、PCR法で行った。PCR産物は、1.5%アガロースゲルで電気泳動後に、臭化エチジウムで染色し、UV Transilluminatorを用いて、UV存在下でバンドの有無およびパターンを検出した。

5) 菌株試験

Bifidobacterium の菌株特異性の確認は、RAPD法で行った。5'CCGCAGCCAA3', 5'AACGCG-CAAC3', 5'GCGGAAATAG3', 5'GAGGA-CAAAG3'の4種類のランダムプライマーを用いて、PCR法で行った⁴⁾⁻⁶⁾。PCR反応液は、鋳型DNA 25 ng, 1.25U TaKaRa Ex Taq, 10× Ex Taq 緩衝液 2.5 μl , dNTP混合液(各2.5 mM) 2.5 μl , MgCl_2 3 mM, プライマー 20 pmolで、総量25 μl で調製した。PCR増幅反応は、Biometra Thermocycler Tgradient (Biometra, Gottingen, Germany)を用いて、最初に 94°C で5分間、 36°C で5分間、 72°C で5分間を4サイクル、ついで 94°C で1分間、 36°C で1分間、 72°C で2分間を30サイクル、最後に 72°C で10分間の伸長反応を行った。PCR産物10 μl は、2.0%アガロースゲルで電気泳動後に臭化エチジウムで染色し、UV Transilluminatorを用いて、UV存在下でPCR産物の多型を検出した。

3. 母乳からの*Bifidobacterium* 伝播試験

このGroupBの試験方法の概要をFig. 1に示す。母乳は滅菌済みチューブに搾乳し、研究に用いた。30組中経膣頭位分娩による出産は15組、帝王切開術での出産は15組であった (Table 1)。児の4日齢または5日齢の糞便も採取した。ただし、2組の児においては糞便量が少なく、培養試験に用いることができなかった。すべての培養試験は、検体採取後、5時間以内で培養を行った。搾乳した母乳においては、*Bifidobacterium* 菌数が低いことが推察されるため⁷⁾、直接培養と増菌培養で行った。母乳および糞便は、嫌気性希釈液Aで10倍希釈系列を調製し検液とした。BL寒天培地、TOSプロピオン酸寒天培地を用いて、培地上に塗布し、 37°C で72時間、ガスパック法にて嫌気培

養した。また、母乳30検体中10検体は、ガラクトオリゴ糖を1%添加したGAM半流動寒天培地(日水製菓, 東京)に母乳を接種し、24から48時間増菌培養した検液を用いて、直接培養と同様の方法で培養した。

4. 統計方法

なお、分娩方法および哺育方法の違いによる児の糞便からの*Bifidobacterium*の出現頻度の判定には、(株)エスミのエクセル統計ソフトを用いた χ^2 検定で有意水準5%で検定を行った。

III. 結 果

1. 母親とその児の糞便における*Bifidobacterium*の菌種分布

母子の糞便が採取できたpair1からpair5において、母子間ですべての*Bifidobacterium*菌種分布が一致する組はいなかった。ヒトから分離される*Bifidobacterium* 8菌種と1群をPCR法で検出した結果、母子間においてpair1では2菌種、pair4では3菌種、pair5では1菌種が一致した (Table 2)。

2. 母親とその児の糞便から分離された

Bifidobacterium 菌株のRAPDタイプの比較

Table 3はTable 2の結果を受けて、高希釈率で分離された菌株に対して、一致した菌種の同定を示したものである。一致しなかった場合、母親の菌種分布結果から、母親の*Bifidobacterium* 菌種が母子で分離されるかを試験した。しかし、高希釈率で分離した児の菌株で一致しなかった際は、母親の分離株の同定はしていない。たとえば、pair1の結果で、0/6は児の糞便から分離した6菌株で、*B. bifidum*は同定されなかったことを示す。母親の*B. longum* 12/50と児の*B. longum* 4/6は、母親の糞便から50菌株分離したうち12菌株と児の糞便から6菌株分離したうち4菌株が一致したことを示す。母子間で一部の*Bifidobacterium* 菌種分布が一致した3つのpair (pair1, pair4, pair5) では、母子から分離した*Bifidobacterium* 菌株で同一菌種が得られた。pair1では*B. longum subsp. longum*, pair4では*B. breve*, *B. longum subsp. longum*, *B. catenulatum* group., pair5では*B. catenulatum* group. が認められた (Table 3)。3つのpair (pair1, pair4, pair5) から得られた各同一菌種の分離菌株は、4種類のラン

Table 2. Distribution of the bifidobacterial species in the feces of the mother and neonate pairs in GroupA

Bifidobacterial species	pair1		pair2		pair3		pair4		pair5	
	mother	neonate	mother	neonaite	mother	neonate	mother	neonate	mother	neonate
<i>B. adolescentis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. angulatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>B. breve</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>B. catenulatum</i> group	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>B. dentium</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. gallicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-

+: positive, -: negative (less than 10⁶cells/g)

B. catenulatum group : *B. catenulatum* , *B. pseudocatenulatum*

Table 3. Bifidobacterial species of the isolated strains from the feces of mother and neonate pairs in GroupA

Bifidobacterial species	pair1		pair2		pair3		pair4		pair5	
	mother	neonate	mother	neonaite	mother	neonate	mother	neonate	mother	neonate
<i>B. adolescentis</i>			n.t	0/10						
<i>B. bifidum</i>	n.t	0/6			n.t	0/10				
<i>B. breve</i>							3/50	1/12		
<i>B. catenulatum</i> group					9/50	3/10	30/50	9/12	24/50	7/10
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	12/50	4/6	n.t	0/10			17/50	2/12		

n.t : not tested

B. catenulatum group : *B. catenulatum* , *B. pseudocatenulatum*

Identification number of strains/Number of isolated strains

Table 4. Comparison of RAPD types of bifidobacterial strains isolated from the feces of mother and neonate pairs in GroupA

RAPD types	pair1		pair3		pair4		pair4		pair5			
	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>		<i>B. catenulatum</i> group		<i>B. breve</i>		<i>B. catenulatum</i> group		<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>		<i>B. catenulatum</i> group	
	mother	neonate	mother	neonate	mother	neonate	mother	neonate	mother	neonate	mother	neonate
type1	3	4	9		3	1	13	9	4	1	23	7
type2	2		3				16		2	1	1	
type3	3						1		5			
type4	2								1			
type5	1								3			
type6	1								1			
type7									3			
total	12	4	9	3	3	1	30	9	19	2	24	7

B. catenulatum group : *B. catenulatum* , *B. pseudocatenulatum*

Number; isolated strains

ダムプライマーによるPCR産物の多型に一致がみられ、同一菌株であることが認められた (Table 4). 母子間で *Bifidobacterium* 菌種分布の一致が全くみられなかった pair3 では、母親の糞便から検出された *Bifidobacterium* 菌種が、児から分離された菌株で同定されるかを確認した。pair2 の児から分離された *Bifidobacterium* 菌株では、同定されなかった (Table 3). また、同様に pair3 では、児から分離された3菌株で、母親からも分離された *B. catenulatum group.* が同定されたが、RAPD法で得られたPCR産物の多型タイプが一致しなかった (Table 4).

3. 母乳からの *Bifidobacterium* 菌株の分離

母乳30検体からは、増菌培養後の検体も含め *Bifidobacterium* は分離されなかった。これに対して、糞便では、28検体中16検体で *Bifidobacterium* が分離された。12の糞便検体で *Bifidobacterium* が分離されなかったが、そのうち7検体が帝王切開術で生まれた児であった。しかし、分娩方法の違いによる腸内細菌叢の分離に関して χ^2 検定により統計学的に有意差はなかった ($p=0.96490$)。また、breast feeding pair と almost bottle feeding pair

でも *Bifidobacterium* の出現に関して、有意差はなかった ($p=0.99125$) (Table 5).

IV. 考 察

今日我々は、諸説ある母親から新生児への細菌の伝播について、妊産婦の糞便と母乳からの伝播に着目した。膣内の細菌叢は性ホルモンの影響を強く受け、出産直後ではエストロゲンの影響によりグリコーゲンが蓄積し、それを利用して *Lactobacillus* などが定着することでpH値を酸性奇りにするが、その後のグリコーゲン量の減少によるpH値の上昇が起こり、糞便等の外部からの細菌が侵入により、細菌叢に変動が起こる⁸⁾。そのため、糞便中の細菌は、出産時に肛門付近の細菌が伝播するのみではなく、膣内に影響することも考えられている。また、妊産婦とヒト成人の腸内細菌、とくに *Bifidobacterium* の菌種分布に差がみられるかをPCR法にて確認したが、妊産婦の *Bifidobacterium* の菌種分布もヒト成人で検出される *B. catenulatum group.* や *B. longum subsp. longum* の検出率が高く、乳児で検出される *B. breve* の検出率

Table 5. *Bifidobacterium* counts in the breast milk and neonatal feces pairs in Group B

Sample no.	Delivery method	Feeding type	Bifidobacterial counts		Sample no.	Delivery method	Feeding type	Bifidobacterial counts	
			(log cfu/g feces)*	(log cfu/ml breast milk)**				(log cfu/g feces)*	(log cfu/ml breast milk)**
1	V	B	9.4	ND	16	C	A	ND	ND
2	C	B	5.9	ND	17	C	B	9.4	ND
3	C	M	ND	ND	18	V	A	6.7	ND
4	C	A	9.4	ND	19	C	B	ND	ND
5	C	B	8.7	ND	20	V	M	ND	ND
6	V	B	NT	ND	(21)	V	A	ND	ND/ND
7	C	B	ND	ND	(22)	V	M	ND	ND/ND
8	C	B	5.3	ND	(23)	V	M	9.2	ND/ND
9	V	B	9.9	ND	(24)	C	A	ND	ND/ND
10	C	B	NT	ND	(25)	C	B	ND	ND/ND
11	V	B	8.8	ND	(26)	C	M	10.8	ND/ND
12	V	B	7.8	ND	(27)	C	M	9.9	ND/ND
13	V	B	9.9	ND	(28)	V	B	9.6	ND/ND
14	V	B	ND	ND	(29)	V	M	10.0	ND/ND
15	C	B	ND	ND	(30)	V	B	ND	ND/ND
Feeding type Bifidobacterial prevalence number/ Sample number of each feeding type			Breast feeding(B) 7/13	Almost bottle feeding(A) 2/5	Delivery method Bifidobacterial prevalence number/ Sample number of each delivery method		Vaginal delivery(V) 9/14	Cesarean section(C) 7/14	

*ND; not detected (less than 4.3 log cfu/g we)

**ND; not detected (less than 1.3 log cfu/ml breast milk)

NT; not tested C; Cesarean section V; vagina B; breast-fed M; mixed-fed A; almost bottle-fed

Performed enrichment culture test (21-30); Normal culture result/Enrichment culture result

Statistics; Chi-square test (Cesarean section compared with vaginal delivery, Breast feeding compared with almost bottle feeding)

が低いことから³⁾、ヒト成人と違いは認められなかった。さらに、*Bifidobacterium*の菌種分布を調べることで、培養法により糞便から高希釈率で分離される*Bifidobacterium*の菌種が推察できることが考えられた。Pair3の児のように、培養法で分離した*Bifidobacterium*菌株が 10^6 /g未満であった場合、PCR法による糞便からの*Bifidobacterium*菌種の検出限界が 10^6 /g程度であるため³⁾、*Bifidobacterium*の菌種分布結果が分離した*Bifidobacterium*菌株の菌種に反映しないことがあった。今回、母子間でRAPDタイプが一致した*Bifidobacterium*菌株は、母子での*Bifidobacterium*の菌種分布がその菌種で一致していた。

松本ら⁴⁾は、出産日の違いが6日間以内の12例を対象に*Bifidobacterium*を分離し、同様のRAPD法を用いて、病院施設環境内の*Bifidobacterium*が医師や看護師などを介して水平伝播する可能性があることを示唆している。その他に、分離された*Bifidobacterium*菌株の多数が、固有のRAPDタイプであったことから、母親の産道や糞便からの伝播の可能性を考察している。最近の報告では、分娩前の母親の糞便での*B. breve*の検出は、1ヵ月齢の児の糞便で検出した*Bifidobacterium*の菌種数や菌数に関連性があり⁹⁾、さらに、Takahashiらはそれらの糞便から分離した*B. breve*の菌株や*B. longum* subsp. *longum*の菌株で母子間伝播があることを明らかにしている¹⁰⁾。我々は先の報告¹⁾では、光岡の報告²⁾と同様に、退院時の4または5日齢で*Bifidobacterium*が優勢になったことから、4または5日齢の児の糞便と分娩後最初の母親の糞便を用いて行った。母子の糞便採取時期に違いはあったが、Takahashiらの報告¹⁰⁾と同様に、本試験においても母子間伝播の可能性が示唆された。また、児の糞便での腸内細菌の定着に関して影響する諸要因を1ヵ月齢の糞便1,000検体以上で調べた結果¹¹⁾では、哺育方法の違いによる*Bifidobacterium*の出現に有意差はなく、今回の結果と同様であった。分娩方法の違いによる*Bifidobacterium*の出現では有意差がみられたが、今回の結果では有意差はなく、糞便採取時期の違いが影響したと考えられた。

一方、産道を通らない帝王切開術で出産した児の糞便からも、14検体中7検体で

*Bifidobacterium*が分離されていることから、早期に獲得する他の経路があることが推察された。Martinらは⁷⁾、出産後4から7日間で、母乳と児の糞便を採取し、*Bifidobacterium*を分離した。母乳から23検体中8検体で*Bifidobacterium*が分離され、母親から分離された*Bifidobacterium*菌種は、児の糞便から分離された*Bifidobacterium*菌種とすべて一致していたが、菌株レベルの試験は行っていない。分娩方法にかかわらず、母乳哺育児での母子間伝播の可能性の一つとして考えられた。本試験では、母乳30検体を試験に供し、母乳中の*Bifidobacterium*菌数が少ないことも考慮して、増菌培養後に選択培地で培養する方法も加えて行ったが、すべての検体から*Bifidobacterium*は分離されなかった。Martinらの報告でも、3割程度の被験者から*Bifidobacterium*が分離されているが⁷⁾、この差については明らかでない。30例のうち1例は、帝王切開術で出産した児で、ほとんど人工乳であったにもかかわらず、早期の*Bifidobacterium*の獲得がみられているため、周囲環境や介助者からの水平伝播を含む他の伝播経路があることは否めない。近年、母乳のミルクオリゴ糖が研究され、ラクト-N-ピオースを含むミルクオリゴ糖を真のピフィズス因子とする新しい仮説が提唱されていることから¹²⁾、新生児が獲得した*Bifidobacterium*に対して、母乳中のピフィズス因子が、乳児期の*Bifidobacterium*の菌種構成とともに、*Bifidobacterium*を主叢とする腸内細菌叢の形成に関与するのではないかと推察される。

新生児や乳児の感染予防には、母親の正常細菌叢を児が獲得し、それが生着することが重要である。とくに、早産児では種々の侵襲的な処置、抗生剤の使用、母乳哺育の遅れなどで、*Bifidobacterium*の生着が困難であり、児にプロバイオティクス (probiotics) を投与することで、細菌感染や新生児壊死性腸炎 (NEC: necrotizing enterocolitis) の発症を予防している^{13) 14)}。*Bifidobacterium*などのプロバイオティクスに関する総説は、これまでもいくつか報告されており^{15)–17)}、新生児医療においても、1990年代からプロバイオティクス) 療法が取り入れられ^{13) 14)}、さらにオリゴ糖などの有用菌の増殖因子としてプレバイオティクス (prebiotics) を併用するシンバ

イオティクス (synbiotics) 療法も応用されている¹⁸⁾。

Kalliomakiらの報告では、生後早期の腸内細菌叢の形成がアトピー症状(アトピー性皮膚炎, アレルギー性鼻炎, 気管支喘息など)発症と関連性があるといわれ¹⁹⁾, 日本でも腸内細菌とアレルギーの研究が行われている²⁰⁾⁻²²⁾。以上の結果から、今後妊産婦へのプロバイオティクスやプロバイオティクスの投与が、腸内細菌叢および腸内細菌叢の形成に影響をおよぼし、それにより新生児の*Bifidobacterium*の獲得を促進し、感染予防やその後のアトピー症状の発症予防に繋がることから、作用機序を含めて明らかにされることは興味深いことであると考えられる。

V. 結 語

乳児期の腸内細菌叢で優勢である*Bifidobacterium*の獲得様式を明らかにするために、本研究では母親の糞便と母乳に着目し、母子間伝播の検討を行った。その結果、母親と児の糞便から分離した*Bifidobacterium*菌株にRAPDタイプの一致がみられたことから、母子間伝播が考えられた。一方、搾乳した母乳からは*Bifidobacterium*菌株が分離されなかったため、母乳の摂取は新生児期の*Bifidobacterium*菌株の獲得に関与しないことが示唆された。新生児期の*Bifidobacterium*菌株の獲得には、母子間伝播以外に周囲環境からの水平伝播などが関与していることが考えられた。今後、妊産婦へのプロバイオティクスの投与が、新生児期の*Bifidobacterium*菌株の獲得に寄与することが明らかにされることに期待する。

本稿は、第113回、第114回日本小児科学会で発表した内容をまとめた。

著者の利益相反 (conflict of interest : COI) 開示 :

本論文の研究内容に関連して特に申告なし

文 献

1) 布山裕一, 外岡俊樹, 和田靖之, 井田博幸. 2歳までの乳幼児腸内細菌叢の縦断的動態と*Bifidobacterium*の

菌種分布. 慈恵医大誌. 2012;127:17-26.

- 2) 光岡知足. 腸内菌の世界. 東京: 叢文社; 1980. p.13-41.
- 3) Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. Appl Environ Microbiol. 1999;65:4506-12.
- 4) 光岡知足. 腸内フローラとプロバイオティクス. 東京: 学会出版センター; 1998. p.57-73.
- 5) Makino S, Okada Y, Maruyama T, Kaneko S, Sasakawa C. PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications. J Clin Microbiol. 1994;32:65-9.
- 6) Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucl Acids Res. 1992;20:5137-42.
- 7) Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 2009;75:965-9.
- 8) 牛島彊. 人体常在菌 共生と病原菌排除能. 大阪: 医薬ジャーナル社; 2001. p.178-9.
- 9) Mikami K, Takahashi H, Kimura M, Isozaki M, Izuchi K, Shibata R, et al. Influence of maternal bifidobacteria on the establishment of bifidobacteria colonizing the gut in infants. Pediatr Res. 2009; 65:669-74.
- 10) Takahashi H, Mikami K, Nishino R, Matsuoka T, Kimura M, Koga Y. Comparative analysis of the properties of Bifidobacterial isolates from fecal samples of mother-infant pairs. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010; 51:653-60.
- 11) Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors Influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics. 2006;118:511-21.
- 12) Kitaoka M, Tian J, Nishimoto M. Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. Appl Environ Microbiol. 2005; 71:3158-62.
- 13) Wang C, Shoji H, Sato H, Nagata S, Ohtsuka Y, Shimizu T, et al. Effects of oral administration *Bifidobacterium breve* on fecal lactic acid and short-chain fatty acids in low birth weight infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007;44:252-7.
- 14) 清水俊明, 藤井徹, 久田研, 東海林宏道, 篠原公一, 大塚宜一. 超低出生体重児の腸管免疫-予防戦略も含めて. 日周産期・新生児会誌. 2006;42:762-8.
- 15) 外岡俊樹, 細野明義. プロバイオティクス, シンバイ

- オティクスとは—プロバイオティクスの保健機能を中心に—。小児内科。2007;39:1060-165.
- 16) 山崎千佳. ビフィズス菌の最近の話題—新生児とプロバイオティクス—. 小児診療. 2009;72:1719-24.
- 17) 辨野義己. プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. Mod Media. 2011;57:277-87.
- 18) 金森豊. 小児外科疾患患児における腸内細菌叢異常とシンバイオティクス療法の効果. 細胞. 2005;37:10-3.
- 19) Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. J Allergy Clin Immunol. 2001;107:129-34.
- 20) Nambu M, Shintaku N, Ohta S. Intestinal microflora at 4 months of age and the development of allergy. Allergol Int. 2004;53:121-6.
- 21) Songjinda P, Nakayama J, Tateyama A, Tanaka S, Tsubouchi M, Kiyohara C, et al. Differences in developing intestinal microbiota between allergic and non-allergic infant: a pilot study in Japan. Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71:2338-42.
- 22) Suzuki S, Shimojo N, Tajiri Y, Kumemura M, Kohno Y. A quantitative and relative increase in intestinal Bacteroides in allergic infants in rural Japan. Asian Pac J Allergy Immunol. 2008;26:113-9.