

## 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

布山裕一<sup>1, 2</sup> 外岡俊樹<sup>3</sup>  
和田靖之<sup>4</sup> 井田博幸<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 松戸市立病院新生児科

<sup>2</sup> 葛飾赤十字産院小児科

<sup>3</sup> 和光堂株式会社

<sup>4</sup> 東京慈恵会医科大学附属柏病院小児科

<sup>5</sup> 東京慈恵会医科大学小児科学講座

(受付 平成 23 年 10 月 13 日)

## VERTICAL MOVEMENT OF INFANT INTESTINAL MICROBIOTA UNTIL TWO YEARS OLD, WITH THE DISTRIBUTION OF BIFIDOBACTERIAL SPECIES

Yuichi FUYAMA<sup>1,2</sup>, Toshiki TONOOKA<sup>3</sup>  
Yasuyuki WADA<sup>4</sup>, Hiroyuki IDA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> *Department of Neonatology, The Matsudo City Hospital*

<sup>2</sup> *Japanese Red Cross Katsushika Maternity Hospital*

<sup>3</sup> *Wakodo Co., Ltd*

<sup>4</sup> *Department of Pediatrics, The Jikei University Kashiwa Hospital,*

<sup>5</sup> *Department of Pediatrics, The Jikei University School of Medicine*

The establishment and formation of normal intestinal microbiota in infants are effective for preventing infectious diseases and atopic dermatitis. To clarify the establishment and formation of the intestinal microbiota of healthy infants, vertical analysis is an appropriate method. To our knowledge, few long-term studies have examined intestinal microbiota in Japanese infants. With the culture method, we found that Enterobacteriaceae were predominant until the second day, and *Bifidobacterium*, Bacteroidaceae, and *Enterococcus* appeared by the fifth day. *Bifidobacterium* continued to predominant until the age of 2 years. With the species-specific polymerase chain reaction method, *Bifidobacterium breve* was detected at a high rate until the age of 2 years. In 2-year-old children the intestinal microbiota and the distribution of bifidobacterial species differed from those of adults. The factors that affected the establishment and formation of intestinal microbiota were administration of an antibiotic, severe diarrhea, and allergic disease in infancy. We obtained information about the establishment and formation of intestinal microbiota by vertical analysis of intestinal microbiota until the age of 2 years. These research findings can be used to further examine changes in intestinal microbiota with specific diseases.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2012;127:17-26)

Key words: development, microbiota, infant, culture method, polymerase chain reaction method

## I. 緒 言

1950年に腸内細菌を集団として捉えた腸内細菌叢の研究が始まり、1970年頃には*Bifidobacterium*やBacteroidaceaeなどの偏性嫌気性菌が分離されるように新たに開発された培養法によって、ヒト腸内細菌叢の研究が進展し、腸内細菌叢の健康と疾病における役割の研究が行われた。培養法は、いくつかの非選択培地と選択培地を使用して、各培地を嫌気性または好気性培養し、培地上に生育したコロニー性状、菌形態から菌群同定と菌数算出をすることで、腸内細菌叢を菌群レベルで包括的に検索することを可能とした方法である<sup>1)</sup>。近年では、常在する腸内細菌叢の乱れを改善させることにより、疾病予防や治療に役立つ手段として乳酸菌などを用いるプロバイオティクス療法<sup>2), 3)</sup>、オリゴ糖などを用いるプレバイオティクス療法<sup>2)</sup>、または両者を組み合わせたシンバイオティクス療法が取り入れられている<sup>4)</sup>。

ヒト腸内細菌は、出生後初めて排泄される胎便では無菌状態であり、数時間後に細菌が出現し、定着、形成していくが、栄養法を始めとする多くの因子の影響を受け変動する。母乳哺育児が腸管内感染症に罹患しにくいことは周知の事実であり、母乳中に含まれる感染防御因子や母乳による腸内細菌叢の形成が重要と考えられる<sup>1)</sup>。一方、1970年代の育児用粉乳は、砂糖の配合を止め、国際規格を参考としてミネラルバランスや脂肪酸を調整した製品が販売されていたが、近年はDHA、 $\beta$ -カロテンなどの微量成分の添加やビフィズス活性物質、生理活性物質の添加、たんぱく質の質的改善として $\beta$ -ラクトグロブリンの低減など、より母乳に近似させるために改良が進められている<sup>5)</sup>。

また、腸内細菌の解析方法は、培養法に加えて分子生物学的手法が用いられるようになり、腸内細菌の全容を解明する研究が取り組まれ、乳児の腸内細菌叢と母乳の重要性または疾病との関連性がより明確になるかもしれない。培養法や分子生物学的手法を用いて、健常な同一被験者の腸内細菌叢の変動を長期にわたって追跡することで、健常な乳児の腸内細菌叢の動態に関する標準が分かれば、栄養法の違いによる影響や疾病とのかか

わりに役立つと考えられた。分子生物学的手法では、乳児期の健康維持に関与する

*Bifidobacterium* 菌種の特異的プライマーが作製され、ヒト腸内細菌叢の解析に応用されている<sup>6)</sup>。本研究は、生後直後から長期的に乳児の腸内細菌叢の動態を解析し、腸内細菌の定着や形成に影響する諸要因を明らかにするとともに、*Bifidobacterium* の菌種分布も併せて検討したので報告する。

## II. 対象と方法

### 1. 被験者

2003年11月と12月に葛飾赤十字産院にて、経膣頭位分娩で出産した10例を対象とした。被験者の保護者には、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し、十分に理解したのちに、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」を遵守して行い、生体試料の取り扱いには、共同研究機関でディープフリーザーの購入および細菌実験室が整備され、「ヒト由来検体マニュアル」を作成することで、検体の取り扱いには十分に留意した。葛飾赤十字産院の臨床研究審査承認後に試験を開始した。被験者10例のうち1例は月齢1まで、もう1例は月齢3までの早期に脱落したため除外し、男児3例、女児5例を対象とした。平均体重2818 gで、母親にアレルギー履歴はなく、喫煙者は1名であった。出生直後に抗生物質アンピシリン（以下、ABPC）の投与を受けた児が1例いたが、全被験者の健康状態は良好であった。採便回数は、入院期間の日齢1、2と退院時の日齢4または5と乳児健診時に行い、計78回採便した。2歳まで採便できた被験者は6例であった。また、1例は月齢3でアトピー性皮膚炎がみられたため、母乳からアレルギー用ミルクに変更したが、月齢6で非特異的IgEの抗体量が100 IU/mlと高く、RAST法による血液検査で、牛乳でクラス2、カゼインでクラス2、 $\alpha$ -ラクトアルブリンでクラス2、 $\beta$ -ラクトグロブリンでクラス2の結果から、ミルクアレルギーと診断した。被験者8例の詳細をFig. 1に示した。

### 2. 実験方法

#### 1) 培養方法

		Infection											
		1 day	2 days	5 days	1 month	3 months	7 months	9 months	12 months	18 months	24 months		
A (Female)													
Birth weight; 2538g				2446g	3470g	5775g	7360g	8250g	8665g	9375g			
Maternal atopic disease; No				Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed			
Maternal smoking record; Yes							Baby food	Baby food	Normal food	Normal food			
Constipation													
B (Female)													
Birth weight; 3588g				3262g	4535g	7260g	9300g	10055g	10720g	11640g	12450g		
Maternal atopic disease; No				Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed			
Maternal smoking record; No							Baby food	Baby food	Baby food	Baby food			
C (Male)													
Birth weight; 2290g				2328g	3815g	6650g	8635g	9235g	9930g	11110g			
Maternal atopic disease; No				Mix-fed	Mix-fed		Bottle-fed	Bottle-fed	Bottle-fed	Bottle-fed			
Maternal smoking record; No							Baby food	Baby food	Baby food	Baby food			
D (Female)													
Birth weight; 3474g				3392g	4640g	7400g	9400g	9920g	10800g	10800g			
Maternal atopic disease; No				Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Bottle-fed	Bottle-fed	Bottle-fed			
Maternal smoking record; No							Baby food	Baby food	Normal food	Normal food			
Milk allergy													
E (Female)													
Birth weight; 2396g				2396g	4080g	5650g	6920g	7855g	7820g	8945g	9700g		
Maternal atopic disease; No				Breast-fed	Mix-fed	Breast-fed	Breast-fed	Breast-fed	Mix-fed	Normal food			
Maternal smoking record; No													
Diarrhea													
F (Female)													
Birth weight; 2694g				2536g	3665g	5470g	7005g	7560g	8150g	9345g	10775g		
Maternal atopic disease; No				Breast-fed	Breast-fed	Mix-fed	Bottle-fed	Bottle-fed	Bottle-fed	Bottle-fed			
Maternal smoking record; No							Baby food	Baby food	Baby food	Baby food			
G (Male)													
Birth weight; 3360g				3092g	4630g	6995g	7480g	9100g	9140g	11530g	12900g		
Maternal atopic disease; No				Mix-fed	Mix-fed	Bottle-fed	Bottle-fed	Bottle-fed	Bottle-fed	Bottle-fed			
Maternal smoking record; No							Baby food	Baby food	Baby food	Baby food			Normal food
Antibiotic use													
H (Male)													
Birth weight; 2204g				2216g	3050g	6345g	8455g	9375g	9790g	10365g			
Maternal atopic disease; No				Mix-fed	Mix-fed	Mix-fed	Mix-fed	Breast-fed	Mix-fed	Mix-fed			
Maternal smoking record; No							Baby food	Baby food	Baby food	Baby food			Normal food

Fig. 1. Characteristics of the subjects after the birth.

採取した糞便は、5時間以内に培養試験に供した。糞便は、嫌気性希釈液A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , L-システイン塩酸塩, Tween80, 寒天) で10倍希釈にし、この液の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), Eggerth-Gagnon (EG) 寒天培地 (メルク, 東京), Trypticase soy blood (TS) 寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン, 東京), Enterobacteriaceaeの選択培地としてDHL寒天培地 (日水製薬, 東京), *Bifidobacterium*の選択培地としてBS寒天培地, Bacteroidaceaeの選択培地としてNBGT寒天培地, *Eubacterium*の選択培地としてES寒天培地, *Lactobacillus*の選択培地として変法LBS寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン, 東京), レシチナーゼ陽性*Clostridium*の選択培地としてNN培地を用いた。これら培地上に0.05 mlずつ滴下し塗布して, TS, DHL寒天培地では好気条件下にて37 °Cで24から48時間培養し, それ以外の寒天培地では嫌気ジャー・スチールウール法にて37 °Cで48時間培養した。培養後, コロニー形態, グラム染色性, 菌形態, 芽胞の有無, 好気性条件下での生育性によって同定した<sup>1)</sup>。培養に用いた糞便以外は, 直ちに-80 °Cのディープフリーザー中に保存し, DNA試験に用いた。

## 2) 糞便pHの測定

糞便pHは0.15M塩化ナトリウム溶液で10倍希釈検液を調製し<sup>7)</sup>, twin pH B-212 (堀場製作所, 京都)を用いて測定した。

## 3) 菌株からのDNA抽出

糞便の $10^7$ または $10^8$ 希釈検液から生育した*Bifidobacterium*の1コロニーを釣菌し, BL寒天培地に塗布して嫌気ジャー・スチールウール法にて37 °Cで48時間培養した。1検体あたり1から10菌株程度分離し, 計328菌株を得た。生育したコロニーは, UltraClean 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) 糞便からのDNA抽出

糞便30 mgを10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH8.0緩衝液に懸濁し, その緩衝液を用いて2度洗浄した。その糞便懸濁液は, リゾチーム (和光純薬工業, 大阪), アクロモペプチダーゼ (和光

純薬工業, 大阪), N-アセチルムラミダーゼ (生化学工業, 東京)の溶菌酵素を用いて処理した<sup>8)</sup>。酵素処理した溶液は, フェノール/クロロホルム法により, DNAを抽出した。DNA溶液は試験に用いるまで, -20 °Cで保存した<sup>9)</sup>。

## 5) *Bifidobacterium*の菌種分布

松木ら<sup>6)</sup>が作製したプライマーを用いて, polymerase chain reaction (PCR)法により*Bifidobacterium*菌種を検出した。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を検出した。

## III. 結 果

### 1. 健常な症例

出産直後の糞便は, 粘性のある黒色の糞便で, 日齢4または5で黄色帯びた糞便になり, 乳児期に新生児期の糞便pH6からpH5へと変動し, 時折緑色の糞便がみられ, 月齢6を過ぎると黄土色で未消化物や黒色の繊維状のものを含むようになった。腸内細菌叢は, 出現の早い順および菌数の多い順に示した (Fig. 2)。健常児 (症例A, C, D)では, 日齢1でEnterobacteriaceaeが出現し, 日齢2まで最優勢であった。日齢5までにBacteroidaceae, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*が出現し, *Bifidobacterium*は退院時である日齢4または5で最優勢になった。*Lactobacillus*は日齢4, 5または月齢1で出現するが, *Bifidobacterium*と比較して100から1000倍低い菌数であった。この時期の*Bifidobacterium*の占有率は, 母乳を主体とした児 (症例A, D)で90%以上, 人工乳の割合が高い児 (症例C)で85%程度であったが, 月齢24まで優勢に推移した。嫌気性菌であるVeillonellaeや*Clostridium*の出現は一過性であるが, 月齢6以降の出現頻度が高い傾向にあった。

### 2. 排便または糞便状態に異常をきたした症例

#### 1) 便秘の児 (症例B)

新生児から月齢6までの糞便性状や腸内細菌の出現状況は, 健常な症例と類似したが, 月齢1から3にかけての*Bifidobacterium*の占有率が60%と低かった。また, 日齢5から月齢6までの総菌数が $10^{11}$ /g程度であったが, 便秘を発症した際か

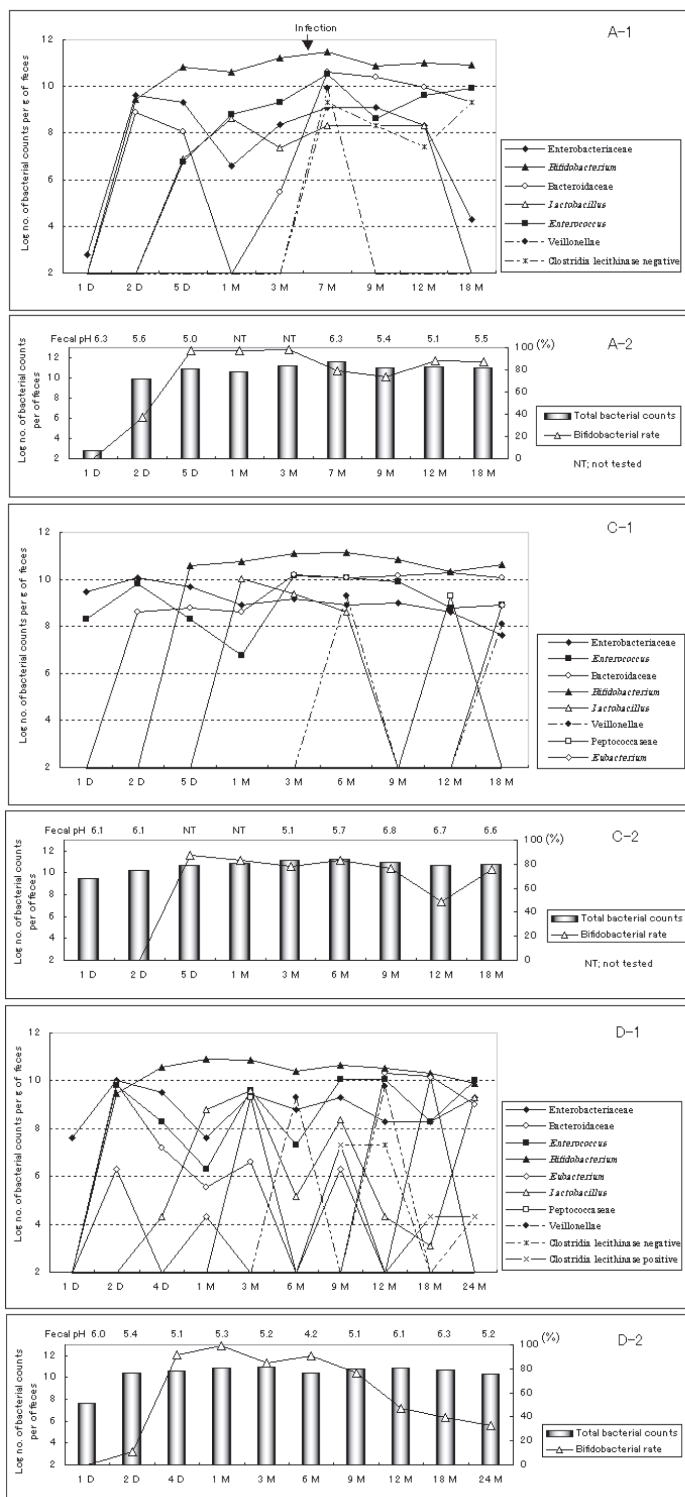


Fig. 2. Changes in counts of individual bacterial groups (A-1, C-1, D-1) and fecal pH and bifidobacterial rate (A-2, C-2, D-2) after the birth in healthy infants. Bifidobacterial rate; bifidobacterial counts/total bacterial counts (%), D; day, M; month.

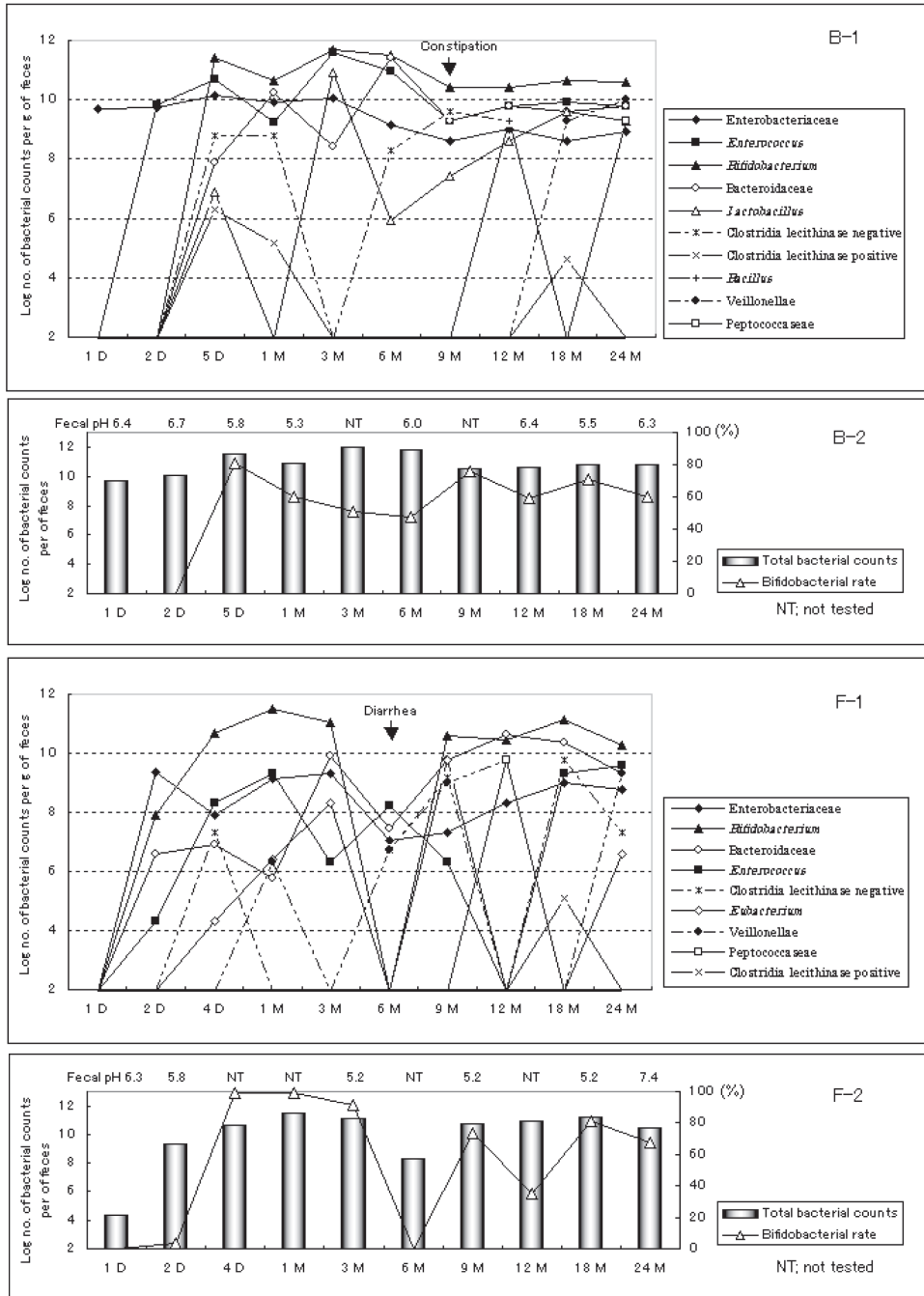


Fig. 3. Changes in counts of individual bacterial groups (B-1, F-1) and fecal pH and bifidobacterial rate (B-2, F-2) after the birth in the constipated infant (B) and the infant with serious diarrhea (F). Bifidobacterial rate; bifidobacterial counts/total bacterial counts (%), D; day, M; month.

ら $10^{10}$ /g程度に減少した。母乳哺育から離乳食を摂り始めてから、排便が2, 3日に1回となり、月齢9の糞便性状は硬めであった (Fig. 3)。

## 2) 重度の下痢を発症した児 (症例F)

新生児から月齢3までの糞便性状や腸内細菌の出現状況は、健常な症例と類似したが、月齢3から6までの期間中に2週間の重度の下痢を発症し、月齢6の採便時の便性は軟便であった児では、腸内細菌は激減した。*Bifidobacterium*はみられず、総菌数は $10^{10}$ /g以上であったものが、 $10^8$ /gまで減少した。その後、月齢9から24までは優勢に推移したが、占有率は40から70%程度と不安定であった (Fig. 3)。

## 3. *Bifidobacterium*の定着が遅延した症例

### 1) 出生直後に抗生物質を使用した児 (症例H)

出生直後にABPCを2回投与したのみであったが、*Bifidobacterium*の出現に影響がみられ、月齢1で出現し、占有率が20%程度であった。月齢3以降は、*Bifidobacterium*が $10^{10}$ /g以上で最優勢に推移し、健常な症例と大差はみられなかった (Fig. 4)。

### 2) ミルクアレルギーを発症した児 (症例E)

*Bifidobacterium*が月齢6まで出現せず、単純な腸内細菌叢であり、*Veillonellae*の出現頻度が高かった。日齢1と2の総菌数 $10^3$ /gは酵母であり (データに示していない)、健常な症例の腸内細菌叢の出現、形成と明らかに異なった (Fig. 4)。

### 3) 新生児期の体重増加量が低かった児 (症例G)

*Bifidobacterium*は月齢1で出現し、占有率が20%程度であった。月齢3以降は、*Bifidobacterium*が $10^{10}$ /g以上で最優勢に推移し、出生直後に抗生物質を使用した症例と類似した。この症例の背景は、新生児期での出生体重へのキャッチアップが遅く、日齢4の体重は出生体重と比較して268g低かった (Fig. 4)。また、新生児期に人工乳の哺乳量が多い症例であった。

## 4. 各日月齢における*Bifidobacterium*菌種の分布

新生児期の*Bifidobacterium*菌種は日齢1では検出されず、日齢2で*B. breve*の他に5菌種が検出された。月齢3ではアトピー症状が疑われる湿疹がみられた児 (症例E)を除き、その他の被験者からは*B. breve*が検出された。離乳食が始まる月齢6以降では、*B. longum* subsp. *longum*と*B. catenulatum* groupの検出頻度が高くなった。

一方、 $10^9$ /gより高い*Bifidobacterium*の優勢菌株を分離し同定した結果、月齢1で*B. breve*の割合が53%、*B. bifidum*の割合が43%であった。それ以降、*B. breve*の割合が7割になり、離乳食、そして普通食を摂るようになる月齢9を過ぎると*B. breve*の割合が低くなり、月齢24では*B. longum* subsp. *longum*が32%、*B. catenulatum* groupが57%になった (Table 1)。

Table 1. Distribution of the species of *Bifidobacterium* in infants

Age	Feces (1 day~18months; n=8, 24 months; n=6) <sup>1)</sup>									Isolated strains (> $10^9$ /g) <sup>2)</sup>								
	BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRE	BiCATg	BiDEN	BiGAL	BiINF	BiLON	BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRE	BiCATg	BiDEN	BiGAL	BiINF	BiLON
1 day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 days	1(13)	0	2(25)	3(38)	2(25)	0	0	1(13)	1(13)	0	0	1(33)	2(67)	0	0	0	0	0
4 or 5 days	1(13)	0	3(38)	5(63)	2(25)	0	0	2(25)	2(25)	0	0	0	22(92)	0	0	0	0	2(8)
1 month	3(38)	0	3(38)	6(75)	1(13)	1(13)	0	2(25)	3(38)	0	0	17(53)	21(53)	1(3)	0	0	1(3)	0
3 months	0	0	3(38)	7(88)	1(13)	1(13)	0	2(25)	4(50)	0	0	2(4)	42(76)	2(4)	0	0	0	9(16)
6 or 7 months	0	0	1(13)	8(100)	0	4(50)	0	2(25)	2(25)	0	0	0	40(74)	0	1(2)	0	0	13(24)
9 months	0	0	1(13)	8(100)	1(13)	3(38)	0	2(25)	4(50)	0	0	0	5(20)	0	4(16)	0	0	16(64)
12 months	0	1(13)	2(25)	8(100)	3(38)	4(50)	0	2(25)	5(63)	0	0	0	15(34)	6(14)	3(7)	0	2(5)	18(41)
18 months	0	0	1(13)	8(100)	3(38)	3(38)	0	2(25)	6(75)	0	0	0	10(22)	17(37)	1(2)	0	0	18(39)
24 months	0	0	1(17)	6(100)	4(67)	3(50)	0	2(33)	5(83)	0	0	0	2(5)	21(57)	2(5)	0	0	12(32)

<sup>1)</sup> Detected samples (Detected samples/Total samples %)

<sup>2)</sup> Identified strains (Identified strains/Total strains %)

BiADO; *Bifidobacterium adolescentis*, BiANG; *Bifidobacterium angulatum*, BiBIF; *Bifidobacterium bifidum*, BiBRE; *Bifidobacterium breve*, BiCATg; *Bifidobacterium catenulatum* group (*Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*), BiDEN; *Bifidobacterium dentium*, BiGAL; *Bifidobacterium gallicum*, BiINF; *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, BiLON; *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*

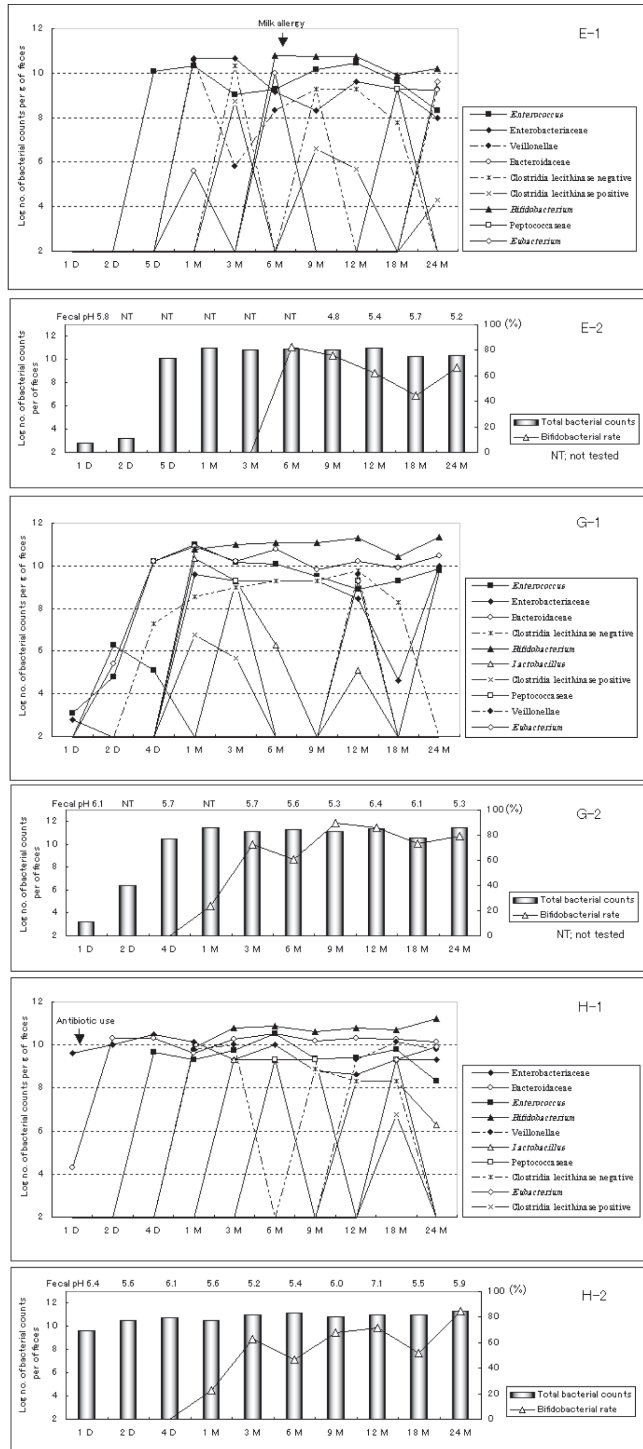


Fig. 4. Changes in counts of individual bacterial groups (E-1, G-1, H-1) and fecal pH and bifidobacterial rate (E-2, G-2, H-2) after the birth in the milk allergy infant (E), the infant had low quantity of weight increase in the neonatal period (G), and the infant administered an antibiotic (H). Bifidobacterial rate; bifidobacterial counts/total bacterial counts (%), D; day, M; month.



#### IV. 考 察

新生児期の腸内常在細菌叢の定着および形成は、外来の侵入細菌の定着防止に大きな役割を果たすだけではなく、病原性を発揮する細菌叢の増殖を抑制するため、感染症を起りにくいものにする colonization resistance といわれる機能がある<sup>10)</sup>。また、Kalliomakiらは、1歳でアトピー症状（アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、気管支喘息など）を発症した児の腸内細菌叢では、生後3週間で *Clostridium* の菌数が高く、*Bifidobacterium* の菌数が少ない傾向にあること<sup>11)</sup> や *Lactobacillus rhamnosus* GG株を出産前の母親と乳児に投与することでアトピー症状を軽減する成績を報告したこと<sup>12)</sup> を発端に、我が国でもアレルギーの発症に先行して起こる腸内細菌叢の差異に注目された。我が国でのアレルギーと腸内細菌叢の関連性では、1歳で卵白IgE値が高かった5例で、月齢4の時に Bacteroidaceae の占有率が10%以上であったこと<sup>13)</sup>、2歳のアレルギー児群で、月齢1および月齢2の時に Bacteroidaceae 菌数が有意に高かったこと<sup>14)</sup>、2歳でアレルギーを発症した児で、*Bifidobacterium* に対する Bacteroidaceae の割合が高かったこと<sup>15)</sup> が報告されている。アレルギー発症にもみられたように、腸内細菌叢の先行的動態変化があることや横断的研究で栄養法による腸内細菌叢の差異がある報告<sup>16)</sup> がされていることから、長期的な腸内細菌叢の動態と健康状態の知見を得ることは重要であると考ええる。長期的な縦断的研究の報告はほとんどなく、近年では1986年に平山が最短で月齢4、最長で月齢15までの腸内細菌叢の解析を行っているのみであること<sup>17)</sup> や育児用粉乳が母乳に近似させる改良が進められていることから、経膣頭位分娩で出産した健常な新生児を対象に2歳までの腸内細菌叢の動態解析を行った。

健常な乳幼児の腸内細菌の動態は、出生後に Enterobacteriaceae が優勢に出現し、ついで *Enterococcus*、*Bifidobacterium* の菌数が増加し、日齢4または5に *Bifidobacterium* が最優勢になり、先行研究の成績<sup>1), 18)</sup> と同様であった。今回の被験者には、出産後から人工哺育児はいなかったが、母乳哺育児と混合哺育児、または乳児期に母乳哺育から混合哺育、混合哺育から人工哺育に変えた児

を比較しても腸内細菌叢の形成に明らかな差はみられず、乳児体重発育曲線と比較しても発育に問題のある児は認められなかった。*Bifidobacterium* は、離乳食を摂り始める頃から占有率が低くなるが2歳まで優勢に推移し、成人で優勢になる Bacteroidaceae は、*Bifidobacterium* より10倍程度低い菌数であることから成人の腸内細菌叢<sup>1)</sup> にいたっていなかった。その他の嫌気性菌群は、離乳食を摂り始めて糞便pHが6程度、あるいはそれ以上になった時に出現する傾向がみられた。一方、*Bifidobacterium* の菌種分布は、成人で *B. breve* の検出率が6%、*B. catenulatum* group が92%である成績<sup>6)</sup> と比較し、2歳で *B. breve* の検出率が100%であることから、成人の菌種分布とは異なっていた。腸内細菌叢の定着、形成に大きな影響を与えた要因は、出生後に抗生物質を投与した児、重度の下痢を発症した児、アレルギーを発症した児であった。ABPCは、胆汁中への排出が多く、常在細菌叢を抑制するため<sup>19)</sup>、*Bifidobacterium* の定着が遅れたことが考えられたが、2回の投与のみで *Bifidobacterium* に影響がみられたので、新生児期における健全な腸内細菌叢の獲得のためには抗生物質の多用は避けるべきであろう。また、授乳期間では、被験者の保護者に投与した抗生物質が、母乳を介して児の腸内細菌叢にも影響を与えることが考えられた。

アレルギーを発症した児では、*Bifidobacterium* の定着が遅延したが、アレルギーの重症度と腸内細菌叢への影響に差異があるかもしれない。本研究では1例のみの結果であり、アレルギーと腸内細菌叢の関連性を明らかにするには、多くの例数を解析する必要があると考える。そのために、より高度な次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢の解析や緻密な動物実験などの知見を蓄積することで解明されるであろう。

#### V. 結 語

生後直後から長期的に乳幼児の腸内細菌叢の動態を解析し、腸内細菌の定着や形成に影響する諸要因を明らかにするとともに、*Bifidobacterium* の菌種分布も併せて検討した。2歳までの乳幼児腸内細菌叢の縦断的動態に関する知見を得た。今後、

各疾患における腸内細菌叢の変動を検討するために、経膈分娩で出生した正常新生児の腸内細菌叢の縦断的動態は、基礎的知見として活用できると考える。

本稿は、第40回日本周産期新生児学会、第110回日本小児科学会、第22回日本母乳哺育学会で発表した内容をまとめた。

### 引用文献

- 1) 光岡知足. ヒトフローラ研究 現在と将来. 腸内細菌誌 2005;19:179-92.
- 2) 高橋志達, 田口晴彦, 神谷茂. プロバイオティクス, プレバイオティクスおよびシンバイオティクス. 臨と微生物 2006;33:147-51.
- 3) Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashita Y. Effects of *Bifidobacterium breve* supplementation on intestinal flora of low birth weight infants. *Pediatr Int* 2004;46:509-15.
- 4) 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.
- 5) 森田洋右. 育児用粉ミルク開発の歴史. チャイルドヘルス 2001;4:332-5.
- 6) 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.
- 7) Langhendries LP, Detry J, Van Hees J, Lamboray JM, Darimont J, Mozin MJ, et al. Effect of a fermented infant formula containing viable *Bifidobacteria* on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:177-81.
- 8) Sakamoto M, Hayashi H, Bennno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex *Bifidobacterial* communities. *Microbiol Immunol* 2003;47:133-42.
- 9) Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA Gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2004 ; 70 : 7220-8.
- 10) van der Waail D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkert-van der Wees JEC. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J Hyg* 1971;69:405-11.
- 11) 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.
- 12) Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease : a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-9.
- 13) Nambu M, Shintaku N, Ohta S. Intestinal microflora at 4 months of age and the development of allergy. *Allergol Int* 2004;53:121-6.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants : composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 1984;28:975-86.
- 17) 平山貴度. *Bifidus* 菌の定着に関する研究 第1篇: 新生児期及び乳児期における腸内細菌叢の形成 - *Bifidus* 菌を中心に -. 日小児会誌 1986;90:1760-8.
- 18) 井関憲一. 新生児の腸内細菌叢形成について. 北海道医誌 1987;62:895-906.
- 19) Finegold SM, Davis A, Miller LG. Comparative effect of broad-spectrum antibiotics on non-sporeforming anaerobes and normal bowel flora. *Ann N Y Acad Sci* 1967;145:268-81.