

**母乳栄養児の腸内におけるビフィズス菌コミュニティ形成には
ヒトミルクオリゴ糖利用能力だけでなく「到達順序」が大きな影響を及ぼす
-ヒトミルクオリゴ糖利用能力の低いビフィズス菌 *B. breve* がコミュニティで優勢となる仕組み-
～科学雑誌『The ISME Journal』誌掲載～**

森永乳業では、長年にわたり乳児の腸内にすんでいるビフィズス菌の基礎研究を行っております。このたび、京都大学の片山高嶺教授およびジョージア工科大学(米国)、サンフォードバーナムプレビス医療研究機関(米国)、新潟大学、滋賀県立大学、京都女子大学、帯広畜産大学、コーク大学(アイルランド)との共同研究により、母乳栄養児^{*1}の腸内に多くすむビフィズス菌4種(乳児型ビフィズス菌;*B. bifidum*、*B. longum* subsp. *infantis* (以下 *B. infantis*)、*B. longum* subsp. *longum* (以下 *B. longum*)、*B. breve*)^{*2}のコミュニティ形成について、以下の点が明らかとなりましたので報告いたします。

- ① ヒトミルクオリゴ糖(以下、HMO^{*3})を糖源としたHMO培地にて、2種のビフィズス菌を時間差で培養した。HMOの利用能力が高い*B. bifidum*および*B. infantis*を先に添加した場合、2菌種とも高い占有率を維持した。これは先に添加された菌種がエサであるHMOの大半を利用し、後から添加されたその他の菌種のエサが不十分な状態になったためと考えられる。
- ② *B. breve*は利用できるHMOが限定的であるにも関わらず、*B. bifidum*、*B. infantis*と同様、HMO培地中に先に添加すると高い占有率を維持し、ビフィズス菌4種を混合して培養した場合も最優勢となった。
- ③ 母乳栄養児の腸内細菌叢データを再解析した結果、出生直後の腸内で*B. breve*が検出された場合、4か月後に*B. breve*が優勢になりやすいことが分かった。よって②は実際の生体内でも起きている現象であると推察された。
- ④ *B. breve*は、*B. bifidum*、*B. infantis*の2種がHMOを利用する過程で放出するフコース^{*4}を利用することで高い占有率を維持すると示唆された。

本研究成果から、乳児型ビフィズス菌の腸内への到達順序とHMOの利用能力が最終的なビフィズス菌コミュニティ形成に大きく影響することが明らかとなりました。この結果は、生後間もない乳児の腸内に定着する細菌が、その後の腸内細菌叢の形成に大きな影響を与えることを示唆していると考えられます。なお、本研究成果^{*5}は、科学雑誌「The ISME Journal」に2022年6月29日に掲載されました。

1. 研究背景

ビフィズス菌は乳児の腸内における主要な細菌です。私たちはこれまでの研究において、母乳中のHMOがビフィズス菌を選択的に増殖させる因子(ビフィズス因子)として機能することを明らかにしてきました。このことから欧米を中心として育児用ミルクへのHMO添加が始まっています。ビフィズス菌は菌種や菌株によってHMOの利用戦略や利用能力が異なっており、どのような場合に特定のビフィズス菌が優

勢となるのかについては不明な点が多く残されていました。特に、*B. breve*は利用できるHMOが限定的であるにもかかわらず、多くの母乳栄養児の腸内において優勢となることから、そのメカニズムの解明が期待されていました。今回、さまざまなHMO利用戦略をとる代表的な乳児型ビフィズス菌4種 (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve*)を用いて、乳児期における腸内細菌叢の形成過程について検討しました。

2. 研究内容

◆研究方法と結果

4種の乳児型ビフィズス菌のHMO利用能力を評価するために、それぞれ単独の培養実験を行いました。4種すべてのビフィズス菌が利用できるラクトース(乳糖)培地ではそれぞれよく増殖したのに対し(図1、破線)、母乳から精製したHMOを糖源として含むHMO培地では*B. bifidum*と*B. infantis*は高い増殖を、*B. longum*は中程度の増殖を示しましたが、*B. breve*はほとんど増殖が認められませんでした(図1、実線)。培養後に残った培地中のHMO(代表的な6種)濃度とゲノム情報から、研究に用いた*B. bifidum*、*B. infantis*は調査した全てのHMOを利用できる一方で、*B. longum*は一部のHMOが利用できず、*B. breve*は利用できるHMOが限定的であることが分かりました(表1)。

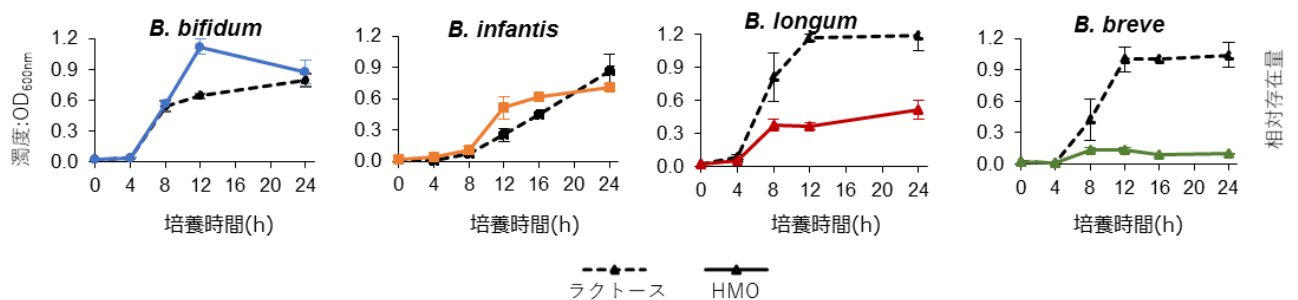


図1. 乳児型ビフィズス菌4種を、HMO培地またはラクトース(対照)で単独培養した場合の増殖曲線(濁度)

濁度が高いことは、それぞれのビフィズス菌が増殖したことを示す。

表1. 試験に用いた乳児型ビフィズス菌のHMO利用能力

ビフィズス菌 HMOの種類	<i>B. bifidum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. breve</i>
LNT	+	+	+	+
LN _n T	+	+	-	+
2'-FL	+	+	+	-
3-FL	+	+	+	-
LDFT	+	+	+	-
LNFP I	+	+	+	-

色: ■ = HMOを利用する; □ = HMOを利用しない

①HMO^{*3}を糖源とした培地(HMO培地)にて、2種のビフィズス菌を時間差で培養した。HMOの利用能力が高い*B. bifidum*および*B. infantis*を先に添加した場合、2菌種とも高い占有率を維持した。これ

は先に添加された菌種がエサである HMO の大半を利用し、後から添加されたその他の菌種のエサが不十分な状態になったためと考えられる。

ビフィズス菌種間の占有率に腸管への到達順序が影響するかを調べるために、4 種のビフィズス菌のうち 2 種を組み合わせる HMO 培地で培養実験を行いました。実験では、1 種目を添加した 12 時間後に 2 種目を添加し、24 時間培養しました。

B. bifidum と *B. infantis* は先に添加した場合、全ての組み合わせで高い占有率を維持しましたが、これは他の菌種を添加する前にエサとなる HMO の大半を利用し、後から添加された菌種の利用できる HMO が不十分な状態になったためだと考えられます(図 2、a,b)。

② *B. breve* は利用できる HMO が限定的であるにも関わらず、*B. bifidum*、*B. infantis* と同様、HMO 培地中に先に添加すると高い占有率を維持し、ビフィズス菌 4 種を混合して培養した場合も最優勢となった。

B. breve は単独培養の場合では、HMO 培地ではほとんど増殖しませんでした(図 1)、*B. bifidum*、*B. infantis* を後から添加した場合は増殖がみられ、高い占有率を維持しました(図 2、d)。ビフィズス菌 4 種全てを同時に HMO 培地へ添加した場合でも、HMO 利用能力では他の 3 種に劣る(表 1)にもかかわらず、*B. breve* が最優勢となりました(図 3)。また、4 種のビフィズス菌の添加順序を様々に変化させた場合においても、*B. breve* がコミュニティ内に早い段階で添加された場合には高い占有率を獲得することが分かりました。

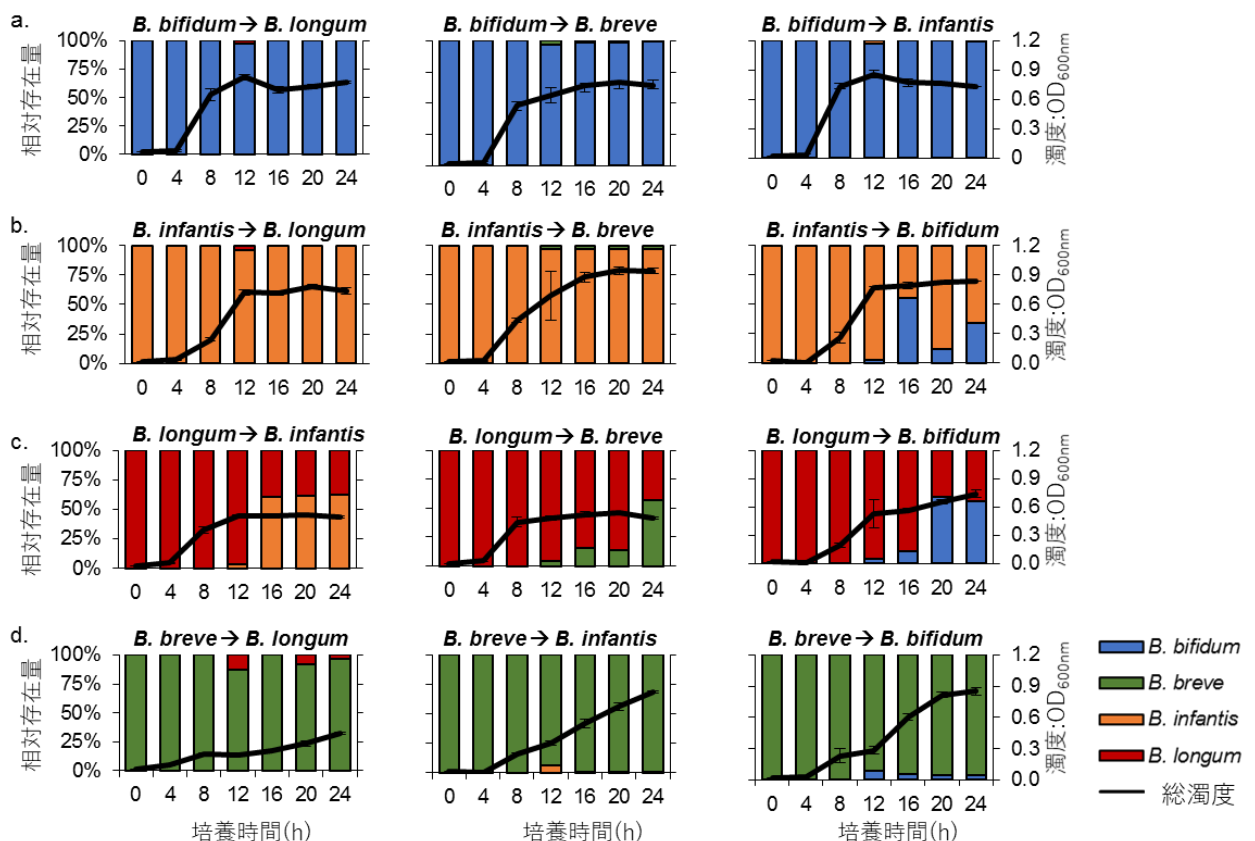


図 2. 乳児型ビフィズス菌 2 種を順に添加して培養した際の各菌種の相対存在量と増殖曲線 (濁度)

- a. *B. bifidum* を 1 番目に添加した場合 b. *B. infantis* を 1 番目に添加した場合
 c. *B. longum* を 1 番目に添加した場合 d. *B. breve* を 1 番目に添加した場合

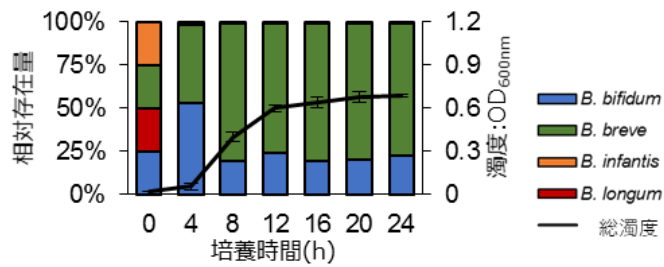


図 3. 乳児型ビフィズス菌 4 種を同時に添加した際の相対存在量と増殖曲線 (濁度)

③母乳栄養児の腸内細菌叢データを再解析した結果、出生直後の腸内で *B. breve* が検出された場合、4 か月後に *B. breve* が優勢になりやすいことが分かった。よって②は実際の生体内でも起きている現象であると推察された。

B. breve が優勢となる過程が、実際の母乳栄養児の腸内でも起こっているかを確認するために、過去に他グループによって報告された 73 名の母乳栄養児の腸内細菌叢を追跡調査したデータ^{*6} を再解析しました。その結果、出生直後の *B. breve* の存在の有無が 4 か月後のビフィズス菌コミュニティ形成に影響していることが分かりました。出生直後に *B. breve* が検出された場合、検出されなかった場合と比べて、生後 4 か月時に *B. breve* が高い占有率になりやすいことが確認されました。このような現象は、他のビフィズス菌種では確認されませんでした。

④*B. breve* は、*B. bifidum*、*B. infantis* の 2 種が HMO を利用する過程で放出するフコース^{*4} を利用することで高い占有率を維持すると示唆された。

他のビフィズス菌種が優勢であった場合と異なり、*B. breve* が優勢になった培地では HMO の構成糖であるフコースがほとんど消費されていました。フコースは *B. bifidum* や *B. infantis* が HMO を利用する過程で細胞外に放出されることが知られています。そこで、フコースの利用能力が *B. breve* の高い占有率に寄与しているとの仮説を検証するため、フコースの取り込みに必要な遺伝子 *fucP* を変異させた *B. breve* 株 ($\Delta fucP$ 株) を用いて、HMO 培地でビフィズス菌 4 種混合培養を 24 時間行いました。その結果、変異を加えていない *B. breve* 野生株に比べ $\Delta fucP$ 株では *B. breve* の相対存在量が大幅に減少しました(図 4)。また、培地中のフコース量を測定したところ、*B. breve* 野生株を含むビフィズス菌 4 種の培地ではフコースが枯渇していたのに対して、 $\Delta fucP$ 株を添加した場合はフコースが蓄積していたことから(図 5)、フコースの利用能力が *B. breve* のビフィズス菌コミュニティにおける高い占有率に強く寄与していることが示唆されました。

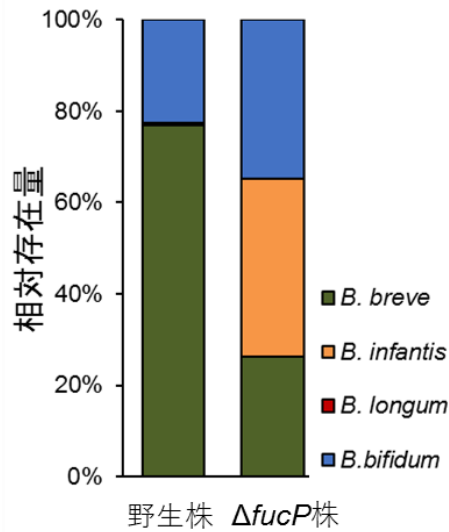


図 4. 乳児型ビフィズス菌 4 種を同時添加し 24 時間培養した後の相対存在量

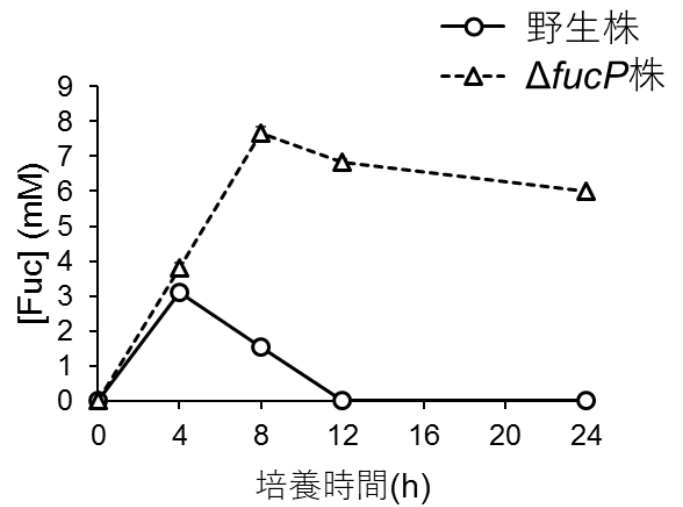


図 5. 培地のフコースの存在量

3. まとめ

今回の研究では、ビフィズス菌の乳児の腸内への到着順序と HMO の利用能力が最終的なコミュニティ形成に大きく影響することと、利用可能な HMO の種類が低少ない *B. breve* が母乳栄養児の腸内で優勢となるメカニズムの一端を明らかにしました。

今後も森永乳業では、乳児の腸内細菌叢形成のメカニズムを明らかにし、乳児の健康に貢献できる正しい情報と優れた素材を発信できるよう、努めてまいります。

<参考>

※1 母乳栄養児

本研究では、完全母乳栄養で育てられた乳児と、母乳と育児用ミルクの混合栄養で育てられた乳児を含む。

※2 ビフィズス菌 4 種 (乳児型ビフィズス菌; *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. breve*)

本試験では、*B. bifidum* JCM 1254 株, *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 株, *B. longum* subsp. *longum* MCC10007 株, *B. breve* UCC2003 株を使用した。

※3 ヒトミルクオリゴ糖(Human Milk Oligosaccharide)

ヒトの母乳のみに高濃度で含まれているさまざまなオリゴ糖の総称。表 1 に示した 6 種が代表的な HMO である。乳児自身の消化酵素では分解されないため腸まで届き、ビフィズス菌などの特定の腸内細菌のエサとなる。

※4 フコース

HMO の分子を構成する単糖の 1 種。

※5 論文タイトル・著者

Priority effects shape the structure of infant-type *Bifidobacterium* communities on human milk oligosaccharides

Miriam N. Ojima^{1*}, Lin Jiang², Aleksandr A. Arzamasov³, Keisuke Yoshida⁴, Toshitaka Odamaki^{1,4}, Jinzhong Xiao^{1,4}, Aruto Nakajima¹, Motomitsu Kitaoka⁵, Junko Hirose^{6,7}, Tadasu Urashima⁸, Toshihiko Katoh¹, Aina Gotoh¹, Douwe van Sinderen⁹, Dmitry A. Rodionov³, Andrei L. Osterman³, Mikiyasu Sakanaka¹, and Takane Katayama^{1*}

¹ Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan

² School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

³ Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA

⁴ Next Generation Science Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Kanagawa, Japan

⁵ Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata, Japan

⁶ School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga, Japan

⁷ Present address: Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University, Kyoto, Japan

⁸ Department of Food and Life Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan

⁹ APC Microbiome Ireland and School of Microbiology, Bioscience Institute, National University of Ireland, Cork, Ireland

※6 Bäckhed, F. *et al.*, Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*, 17, 690-703 (2015).