

**母乳および乳児用調製乳に関する
母子栄養・乳児栄養学的研究**

2020年2月

神野 慎治

目次	2
略語表	3
序論	4
1. 周産期マウスの Prebiotics 摂取が腸内細菌叢と母乳分泌型 IgA に及ぼす影響	7
1-1. 緒言	
1-2. 方法	
1-3. 結果	
1-4. 考察	
図表	12
2. 周産期の Prebiotics 摂取が母親および出生乳児の腸内細菌叢に及ぼす影響	17
2-1. 緒言	
2-2. 方法	
2-3. 結果	
2-4. 考察	
図表	23
3. タンパク質含量を低減した乳児用調製乳の乳児発育への影響	30
3-1. 緒言	
3-2. 方法	
3-3. 結果	
3-4. 考察	
図表	36
4. 乳児用調製乳の栄養組成と乳児による摂取量との関連	41
4-1. 緒言	
4-2. 方法	
4-3. 結果	
4-4. 考察	
図表	47
総合考察	55
謝辞	57
引用文献	58

略語表

ANOVA, analysis of variance

ARA, arachidonic acid

DHA, docosahexaenoic acid

FAO, Food and Agriculture Organization

FDA, Food and Drug Administration

FOS, fructooligosaccharides

IgA, immunoglobulin A

PCR, polymerase chain reaction

PBS, phosphate buffered saline

RNI, Recommended Nutrient Intake

WHO, World Health Organization

序論

哺乳動物は母親から、胎児期には血流を介して、乳児期には母乳を介して、さらに腸内共生細菌による修飾を受けつつ、発育・発達に必要な要素を獲得する(Figure S1)。胎児は母親から胎盤を經由して栄養や免疫グロブリンを得る。新生児および乳児は、母親との接触など多様な外環境に暴露されることで腸内細菌を獲得し、また、生体防御に必要な分泌型免疫グロブリン A(IgA)と急速な発育に必要な栄養を主に母乳から得る。これらの要素のうち、母乳からの分泌型 IgA の供給と腸内共生細菌叢の形成における母子間垂直伝播は乳児の腸管環境(体外環境)形成を介して、母乳中の栄養成分は消化・吸収と体内での代謝を介して、乳児の発育・発達に影響を及ぼしている。本論文は、母乳中の分泌型 IgA および母親腸内細菌の乳児腸管への母子伝播および乳児用調製乳の栄養組成が乳児の適切な発育と発達に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実施した一連の研究により得られた成果を博士学位論文としてまとめたものである。

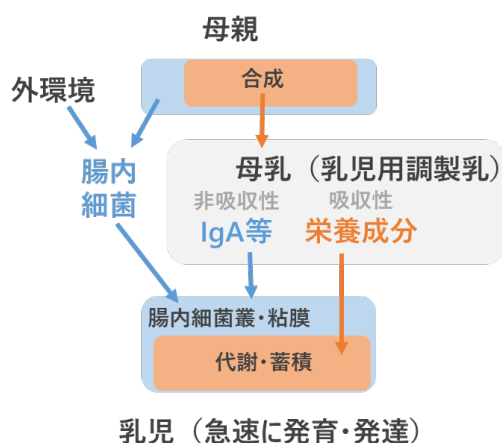


Figure S1. 出生後の母子栄養

母乳に含まれる分泌型 IgA (sIgA) は、乳児腸管において感染防御や腸内細菌叢の維持や安定化に寄与している。sIgA は、腸管や気道等の粘膜にムチンとともに主要成分として存在し、粘膜からの外敵・異物の侵入を防ぐための腸管バリア機能の維持に重要である^{1,2}。さらに腸内細菌叢の維持や安定化にも寄与していると考えられている^{3,4}。sIgA は、唾液、涙や腸液などの外分泌液に含まれており、母乳中、特に初乳中に高濃度に含まれている。母乳中 IgA は乳児の粘膜免疫が発達・成熟するまでの間、腸管粘膜バリア機能の維持に主要な役割を果たしている。sIgA を乳児に効率的に供給することは、母乳への sIgA の分泌量を増やすことで可能となるが、乳腺におけるその合成と分泌の制御機構は不明である。乳腺に存在する IgA 分泌細胞(形質細胞)の由来は小腸パイエル板であると考えられており^{5,6}、また、腸管 sIgA レベルは Prebiotics (健康の維持・増進につながる

健全な腸内細菌叢の形成を促す食品成分)の摂取によって腸管粘膜免疫系が賦活化されることにより高まることが示されている^{7,8}。研究項目1では「母親の腸管粘膜免疫系を Prebiotics 摂取により腸内細菌叢を介して賦活化することで、母乳中 sIgA 濃度が増加するか」という機構的な問いに対する解を得ることを目的として、マウスモデルを用いた実験研究を実施した(研究1⁹、Figure S2)。

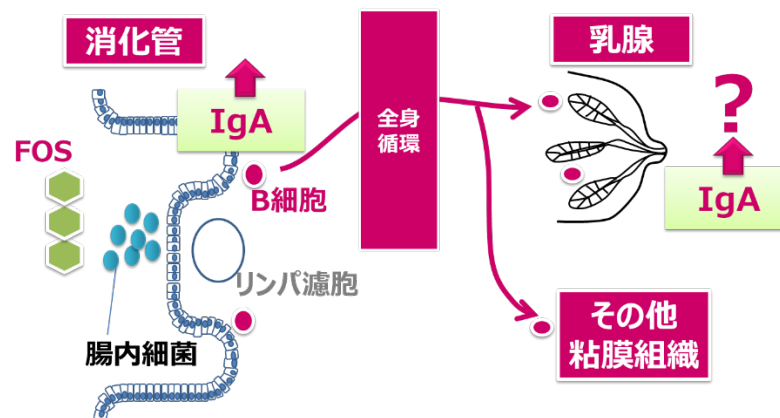


Figure S2. 腸管免疫の不活化による遠隔粘膜での IgA 分泌促進(仮説)

腸内細菌叢は一部の栄養成分の供給と体内への吸収、病原菌の増殖抑制、感染防御等に関与し、さらには乳児の免疫系の発達・維持に影響すると考えられている。乳児のビフィズス菌主体の腸内細菌叢の形成は、胎内で無菌であった腸内に分娩～新生児期に主に母親から菌が伝播することで始まる¹⁰。腸内細菌叢は乳児の栄養や病原菌の腸管管腔内での増殖抑制に関与し¹¹、さらには乳児の免疫系の発達と成熟にも影響する^{12,13}。乳児期の腸内細菌叢形成は、母親の腸内細菌叢、分娩法および栄養哺育方法等による影響も受ける可能性が指摘されている¹⁴。研究項目2では、母乳栄養児のビフィズス菌主体の腸内細菌層形成に対して母親の腸内細菌層がどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的にヒトを対象にした介入試験を実施した(研究2¹⁵)。

乳児期の健全な成長や将来の健康には、乳児期のタンパク質栄養が直接的に影響し得る。乳児は、発育不良や腎臓への過剰負担等を避けるために過不足のない量のタンパク質を摂取する必要がある。乳児期のタンパク質摂取量が過剰になると生後6ヵ月でBMIが有意に高くなり、その影響が離乳後の幼児期以降も維持されたことが報告されている¹⁶。このように、乳児期の栄養が離乳後の発育や健康にも影響するという概念(DOHaD)が立証されつつある中で、乳児用調製乳のタンパク質含量は国際的に急速に減量されてきている。日本で市販されている乳児用調製乳Aでは、エネルギーあたりのタンパク質量を以前の2.3 g/100 kcalから2.2 g/100 kcalに低減し、母乳の平均値(1.9±0.43 g/100 kcal)¹⁷により近づけている。このような背景から、研究項目3では、乳児

用調製乳 A の哺乳が乳児の発育に及ぼす影響を明らかにするための乳児発育調査研究を実施した(研究 3¹⁸)。

乳児期の栄養は、乳児期だけでなく離乳後の幼児期およびそれ以降の発達・発育や健康状態にも影響し得る¹⁹⁻²¹。このため、乳児は過不足のない適正な量の栄養を母乳および乳児用調製乳(乳と称する)から摂取することが重要である。乳児の栄養摂取量は、乳の栄養組成と、変動要因である乳の摂取量(乳児が自発的に飲んだ乳の容積:哺乳量)の積で決まるため(Figure S3)、「乳の摂取量がどのようにコントロールされているか」は乳児栄養を理解するための重要な観点である²²。しかしながら、乳児が摂取する母乳の量を正確に測定することが困難なこともあり、乳の摂取量に関する詳細な解析はこれまでほとんど行われていない。一方、乳児が摂取する乳児用調製乳の量は、調製した乳量と飲み残した乳量から比較的正確に見積もることが可能である。研究項目 4 では、乳児用調製乳で哺育された乳児における「乳の摂取量」とその調整機構を明らかにするための調査研究を実施した。あわせて、乳児用調製乳により哺育された乳児(人工栄養児)の栄養摂取量が適切であるかを解析した(研究 4²³)。

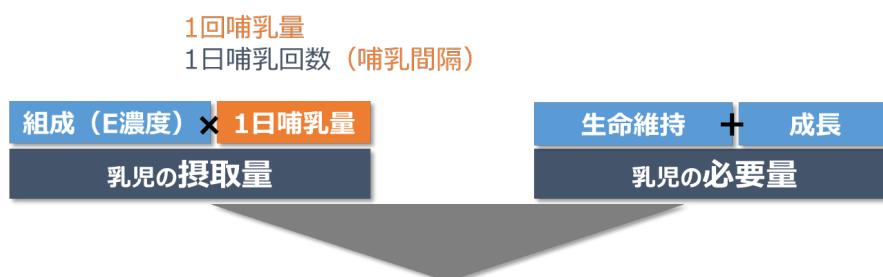


Figure S3. 乳児における栄養の必要量と摂取量の関係

1. 周産期マウスの Prebiotics 摂取が腸内細菌叢と母乳分泌型 IgA に及ぼす影響

1-1. 緒言

Prebiotics は、特定の腸内細菌の増殖を選択的に促進することで宿主の健康を増進する難消化性食品のことである。フラクトオリゴ糖(FOS)は Prebiotics の 1 つであり、ケストース、ニストース、およびフラクトシルニストースの混合物である。FOS の一次生理作用は、大腸ビフィズス菌の優先的増殖作用である²⁴⁻²⁷。その他に、脂質代謝調整作用^{28,29}、整腸作用^{25,30}、ミネラル吸収促進作用³¹、潰瘍性大腸炎改善作用³²等が示されている。加えて、FOS やケストースの摂取はげっ歯類で消化管での IgA 産生を高めることが示されている^{7,8,33,34}。

腸内細菌は腸管 IgA レベルに影響を及ぼすことが示されている。ラットにおいて大腸の乳酸菌数と腸管 IgA 濃度の相関関係が確認されている³⁴。さらに、腸管内のバクテロイデス属菌はパリエル板由来の B 細胞の IgA 陽性細胞への分化を促進すること³⁵、および B 細胞は粘膜関連リンパ組織(GALT)から各粘膜に移行する(ホーミング)ことが示されている³⁶。

そこで本研究では、「母親の腸管粘膜免疫系を Prebiotics 摂取により腸内細菌叢を介して賦活化することで、母乳中 sIgA 濃度が増加するか」という機構的な問いに対する解を得ることを目的として、マウスモデルを用いた実験研究を実施した。

1-2. 方法

飼料および動物

対照飼料として AIN-93G を、ケストース飼料として AIN-93G 中のコーンスターチの一部(5%)をケストース(MeiologoCR®、明治フードマテリア、東京、日本)に置き換えた飼料を使用した(Table 1-1)。BALB / c 雌マウス(日本 SLC、静岡、日本)をプラスチックケージで個別に飼育した。BALB/c マウスを対照群(n = 11)とケストース群(n = 7)の 2 群に分け、交配日(出産の約 19~21 日、出産の日を 0 日と指定)から解剖時まで、対照飼料とケストース飼料をそれぞれ自由摂取させた。出産後、仔マウスの数が 4~6 匹となるように調整した。泌乳 7 日目と泌乳 14 日目に、オキシトシン(1 IU)の皮下注射後に母乳を採取した。すべての実験プロトコルは、明治乳業株式会社の動物倫理委員会に承認されている。

便および小腸のサンプル調製

泌乳 17 日目の母獣に、ケタミン塩酸塩 (70 mg / kg 体重; Wako Pure Chemical) と塩酸キシラジン (8 mg / kg 体重; ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, USA) の腹腔内注射後により麻酔し、糞便を採取した後、全採血により安楽死させた。その後、消化管を摘出した。胃出口から盲腸入口までを小腸とし、小腸の上流と下流を等分してそれぞれを空腸と回腸とした。盲腸出口から結腸までを大腸とした。各セグメントの管腔内容物を氷冷 PBS で洗い流した後、各組織の重量を測定した。各組織を 20 倍量のフッ化フェニルメチルスルホニル (1 mmol / L)、EDTA (5 mmol / L)、大豆トリプシン阻害剤 (100 mg / mL)、ロイペプチン (100 mg / mL)、およびアプロチニン (50 mmol / L トリス-HCl [pH 6.8] 中 100 kIU / mL) を含む PBS 溶液中で物理的にホモゲナイズした。この組織懸濁液を 10,000g で 15 分間遠心分離し、得られた上清を腸の IgA アッセイ用の組織抽出物として使用した。

便中細菌数の測定

細菌中の DNA を凍結乾燥した糞便 20mg より QIAamp stool mini kit (QIAGEN; Valencia, CA, USA) を用いて抽出し、使用するまで -20°C で保存した。糞便中各腸内細菌数は、以下に示す特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR により測定した^{37,38}。

<i>Bifidobacterium</i> spp. sense primer,	5' -CTCCTGGAAACGGGTGG-3';
<i>Bifidobacterium</i> spp. antisense primer,	5' -GGTGTTCTTCCCGATATCTACA-3';
<i>Lactobacilli</i> spp. sense primer,	5' -CTCAAACTAAACAAAGTTTC-3';
<i>Lactobacilli</i> spp. antisense primer,	5' -CTTGACACACCGCCCGTCA-3';
<i>Bacteroides</i> spp. sense primer,	5' -ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT-3';
<i>Bacteroides</i> spp. antisense primer,	5' -CCAGTATCAACTGCAATTTTA-3'.

Bifidobacterium spp. と *Lactobacilli* spp. の PCR でのアニーリング条件は 60°C で 30 秒間、*Bacteroides* spp. の PCR でのアニーリング条件は 50°C で 30 秒間とした。

総 IgA の測定

マウス母乳、血清、および組織抽出物の総 IgA 濃度は、サンドイッチ ELISA 法により測定した。96 ウェルマイクロプレート (Nunc A / S; Roskilde, Denmark) に $100\ \mu\text{L}$ のラット抗マウス IgA 抗体液 (0.15 M PBS 中 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$; Pharmingen, San Diego, CA, USA) を用いて 1 次抗体をコーティングした (4°C 終夜)。0.05% (w / v) Tween 20 を含む $125\ \mu\text{L}$ の PBS (PBS-T) で 3 回洗浄した後、 $125\ \mu\text{L}$ の 1% (w / v) ウシ血清アルブミン (BSA; Intergen, Purchase, NY, USA) を含む PBS-T を用いてプロ

ッキングした(室温で 30 分間)。実験サンプルまたは標準マウス IgA(マウス骨髄腫タンパク質; ICN Biomedicals、Inc .; 米国カリフォルニア州コストメサ)の希釈溶液を、NaCl(0.5 mol / L)および 0.1% Tween20を含むPBSで調製した。希釈した標準サンプルをコーティングしたウェルに二重に加えた。4°Cで一晩インキュベートした後、プレートを洗浄し、100 μ L のビオチン化ラット抗マウス IgA 抗体(50 ng / mL; Pharmingen)を含む PBS-T を各ウェルに加えた。室温で 2 時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、100 μ L のアルカリホスファターゼ結合アビジン(1mg / mL; Organon Teknika Corporation、Durham、NC、USA)を各ウェルに加えた。洗浄後、100 μ L のリン酸 p-ニトロフェニル(1 mg / mL の PNPP を含むジエタノールアミンバッファー[pH 9.8])をウェルに加え、室温で発色させた。50 μ L の 5 mol / L NaOH を添加して発色を終了した後、各サンプル/標準について 405 nm の吸光度を測定した。検量線から試料中の IgA 濃度を求めた。

抗原特異的 IgA 抗体価の測定

特異的 IgA 抗体価は、ELISA 法により測定した。96 ウェルマイクロプレートに、ホルマリン固定バクテロイデス属菌またはラクトバチルス属菌(いずれもマウスの糞から分離)の抗原(炭酸緩衝液(pH 9.6)でコーティングした。その後、100 μ L の PBS-T で 3 回洗浄した。次いで、ウェルを 120 μ L の 0.5% [w / v]ゼラチンでブロッキングし(室温で 2 時間)、PBS-T で再び洗浄した。希釈したマウス母乳サンプルをウェルに加えた。抗原に結合した IgA 抗体を総 IgA の測定と同一の方法で検出し、405 nm の吸光度を抗原特異的 IgA 抗体価とした。

統計解析

集計データは平均値 \pm 標準偏差で示した。2 群間の差の検定には、Student's t-test または a two-way ANOVA with repeated measures を用いた。相関の検定には、Pearson's correlation coefficient analysis を用いた。すべての検定について、 $P < 0.05$ の比較結果を有意とした。

1-3. 結果

対照群とケストース群の母獣は 5~10 匹の子を出産した。泌乳 17 日目(解剖直前)の体重、

小腸重量、および糞便中 *Lactobacillus* 属菌数に群間の差は認められなかった (Table 1-2)。大腸重量、糞便中 *Bifidobacterium* 属菌数、および糞便中 *Bacteroides* 属菌数はケストース群で対象群より多かった (Table 1-2)。各組織の総 IgA 濃度については、回腸組織と血清で群間の差は認められなかったが、空腸組織と大腸組織ではケストース群で対象群より有意に高値であった (Table 1-3)。

出産後 7 日目と 14 日目のマウス母乳中の sIgA レベルを Figure 1-1 と Table 1-4 に示す。二元配置分散分析 ANOVA において、総 sIgA 濃度に対するケストース摂取と泌乳期の有意な効果が認められ (Figure 1-1, $P < 0.05$)、交互作用は認められなかった。同様に、*Bacteroides* 属菌特異的 sIgA 濃度に対するケストース摂取と泌乳期の有意な効果が認められ (Table 1-4, $P < 0.05$)、交互作用は認められなかった。糞便中 *Bacteroides* 属菌数と母乳中総 IgA 濃度 (Figure 1-2, $r = 0.55$, $P < 0.05$)、および糞便中 *Bacteroides* 属菌数と母乳中 *Bacteroides* 属菌特異的 IgA レベル (Figure 1-2, $r = 0.80$, $P < 0.05$) のそれぞれに有意な正の相関が認められた。

1-4. 考察

Prebiotics 摂取は腸管粘膜だけでなく乳腺粘膜でも IgA レベルを高めることが示された⁹。Prebiotics 摂取が腸管 IgA を高めることは、本研究を含む様々な研究で明らかにされている^{7,8}。これまでに、ビフィズス菌およびバクテロイデス菌は腸管 B 細胞の分化や IgA 産生を促進することが確認されていることから^{35,39}、本研究で観察された腸管 IgA レベルの上昇は *Bifidobacterium* 属菌および *Bacteroides* 属菌の増殖を介して B 細胞の形質細胞への分化が促進されたことによって生じたと考えられる。本研究では、Prebiotics 摂取に起因するこれらの作用が遠隔粘膜の乳腺にまで及ぶことを初めて明らかにした。

Prebiotics 摂取が腸管から離れた乳腺でも IgA レベルを上昇させたことには、B 細胞の乳腺粘膜へのホーミングが関与していると推定された。本研究では、上記の推定を裏付ける 2 つの観察結果が得られている。1 点目は、Prebiotics 摂取による IgA 上昇が血清中 IgA では認められなかったことである (Table 1-3)。このことは、乳腺粘膜で IgA 産生が活性化されていることを示唆している。マウス乳中の IgA の由来は、泌乳初期は血中からの移行であるが、その後は乳腺組織で産生されたものであると考えられている³⁶。さらに過去の報告では、B 細胞はパイエル板細胞で IgA 陽性細胞に分化し、乳腺に移行した後に形質細胞に分化することが報告されている^{5,6}。これらの知見

は、本研究での観察結果と整合性がある。2点目は、糞便中 *Bacteroides* 属菌数と母乳中総 IgA 濃度に正の相関関係が認められたことである。過去の報告においてもこれに類似した相関関係(腸内細菌数と大腸 IgA 濃度)が示されている³⁴。これらのことは、本研究で認められた母乳中 IgA レベルの上昇に腸内細菌の活性化が関与していることを示唆している。今後、免疫細胞の腸管から乳腺へのホーミングの詳細な機構の解明が期待される。

母乳中 IgA の増加は仔の腸内細菌叢の安定化にも寄与している可能性が考えられる。IgA は粘膜表面の微生物や抗原に結合して侵入を阻止する役割だけでなく^{1,2}、腸内常在菌に結合することによる細菌とその近傍の宿主免疫細胞との共生の安定化にも寄与している³⁴。本研究では、ケストースの摂取が母乳中の *Bacteroides* 属菌特異的 IgA 抗体価を上昇させることを確認している。*Bifidobacterium* 属菌特異的 IgA 抗体価についての評価はできていないが、同様の上昇が起きている可能性もある。ケストース摂取による母乳中の特異的 IgA 抗体価の上昇が乳仔期の腸内細菌への免疫応答を改善することが期待されるが、今後の研究での実証が必要である。

本研究では、周産期の Prebiotics 摂取は母乳 IgA 分泌を増やすこと、およびこの作用は腸内細菌叢を介した腸管由来 B 細胞の活性化と遠隔粘膜である乳腺への移行を経て生じている可能性が示された。すなわち、周産期マウスに Prebiotics を投与することで、母子免疫の主体の一つである母乳 sIgA の十分な付与を介して乳児の適切な腸管免疫発達および腸内細菌叢形成を促すことができると考えられた。

图表

Table 1-1. Components of the Control and Experimental Diets Fed ad libitum to Mice during Pregnancy and Lactation to Determine their Effects on IgA Levels in Mouse Milk⁹.

Ingredients (g/100 g mouse diet)	Type of Diet	
	Control	1-kestose-supple mented
Casein	20.0	20.0
Cornstarch	39.7	34.7
1-kestose	–	5.0
Dextrinized cornstarch	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0
Soybean oil	7.0	7.0
Fiber	5.0	5.0
Mineral mix (AIN93GMX)	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN93GVX)	1.0	1.0
L-cystine	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25
tert-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014

Table 1–2. Maternal Weight and Fecal Microbiota Count of the Control and 1–Kestose–Supplemented Mice Groups Late in the Lactation Stage (Day 17)^{a 9}.

	Control diet (<i>n</i> = 11)	1–kestose–supplemented diet (<i>n</i> = 7)
Body weight (g)	29.0 ± 2.0	29.0 ± 1.7
Small intestinal weight (g)	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2
Colon weight (g)	0.26 ± 0.03	0.32 ± 0.03 ^c
Fecal microbiota^b		
<i>Bifidobacterium</i>	10.5 ± 0.6	11.1 ± 0.3 ^c
<i>Lactobacillus</i>	9.5 ± 0.6	9.8 ± 0.4
<i>Bacteroides</i>	10.5 ± 0.6	11.4 ± 0.5 ^c

CFU, colony–forming units

^aAll data are expressed as mean ± SD values.

^bFecal microbiota counts are expressed as log₁₀ CFU/g dry feces.

^cValue differs significantly from the control value (*P* < 0.05, Student’ s *t*–test).

Table 1–3. Total IgA Levels in the Intestinal Tissue and Serum Samples of the Control and 1–Kestose–Supplemented Mice Group at 17 Days after Delivery^{a 9}.

Tissue extract or fluid	Control diet (<i>n</i> = 11)	1–kestose–supplemented diet (<i>n</i> = 7)
Jejunum (mg/organ)	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.3 ^b
Ileum (mg/organ)	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1
Colon (mg/organ)	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1 ^b
Serum (mg/mL)	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1

^aAll data are expressed as mean ± SD values.

^bValue differs significantly from the control value (*P* < 0.05, Student’ s *t*–test).

Table 1-4. Specific IgA Levels, Reported as the Absorbance at 405 nm, in the Milk of Lactating Mice in the Control and 1-Kestose-Supplemented Groups^a.

	Control diet (<i>n</i> = 11)	1-kestose-supplemented diet (<i>n</i> = 7)
Level of anti-<i>Bacteroides</i> IgA^b		
Day 7	0.08 ± 0.03	0.13 ± 0.04
Day 14	0.14 ± 0.13	0.34 ± 0.22
Level of anti-<i>Lactobacillus</i> IgA		
Day 7	0.02 ± 0.05	0.01 ± 0.06
Day 14	0.09 ± 0.05	0.13 ± 0.06

^aAll data are expressed as mean ± SD values.

^bA two-way ANOVA with repeated measures showed significant effects of 1-kestose supplementation and measurement day during lactation ($P < 0.05$), with no interaction between factors.

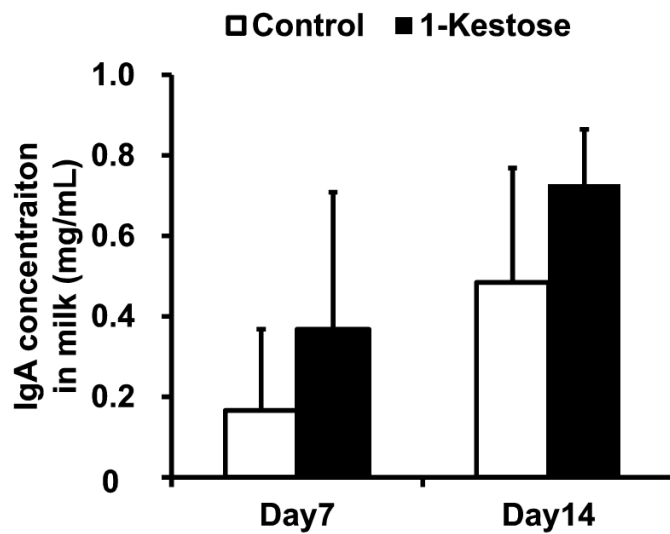


Figure 1-1. Effects of Dietary Supplementation with 1-Kestose on Total IgA Concentration in Mouse Milk⁹. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure total IgA concentration in milk samples that had been collected from maternal mice fed a control diet (n = 11) or a diet supplemented with 1-kestose (n = 7) at 7 and 14 days after delivery. Data are expressed as mean \pm SD values. A two-way ANOVA with repeated measures showed significant effects of 1-kestose supplementation and measurement day during lactation ($P < 0.05$), with no interaction between factors.

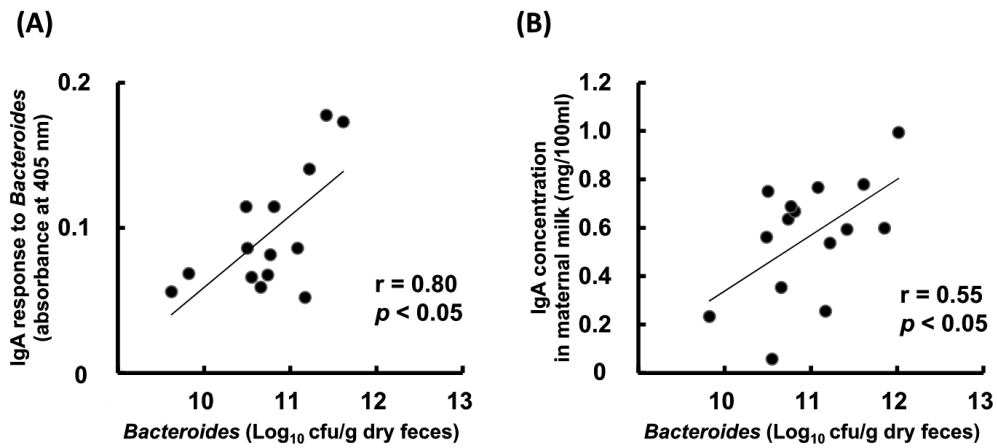


Figure 1–2. Correlation between *Bacteroides* spp. Count in Maternal Feces and (A) the Level of anti-*Bacteroides* IgA or (B) Total IgA Concentration in Milk⁹. The *Bacteroides* spp. count in fecal samples collected at 17 days after delivery was measured. (A) Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the level of anti-*Bacteroides* IgA in milk collected at 14 days after delivery. *Bacteroides* spp. that had been isolated from mice feces were used as the coating antigen. The absorbance at 405 nm, indicating the level of anti-*Bacteroides* IgA, was measured. (B) Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the total IgA concentration in milk collected at 14 days after delivery.

2. 周産期の Prebiotics 摂取が母親および出生乳児の腸内細菌叢に及ぼす影響

2-1. 緒言

ヒト乳児の腸内細菌叢はビフィズス菌が優勢であり¹⁰、出生後のビフィズス菌の生着は腸内細菌層の母から子への伝播により生じる^{40,41}。この腸内細菌の母子伝播は、様々な要因、例えば在胎週数⁴²、分娩方法⁴³、周産期の抗菌物質の使用⁴⁴、および栄養法⁴⁵等の影響を受ける¹⁴。乳児のビフィズス菌優勢な腸内細菌叢は、乳児の栄養や免疫発達に重要な役割を果たしていることから¹¹⁻¹³、新生児期の腸内細菌叢形成を、安全に適正化する機構・方法の解明に注目が集まっている。その代表例が、妊婦への Prebiotics の投与である⁴⁶。しかしながら、研究事例が極めて限られているため、一定の結論は得られていない。

本研究では、母乳栄養児のビフィズス菌主体の腸内細菌層形成に対して母親の腸内細菌層がどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的にヒトを対象にした介入試験を実施した。母親の腸内細菌叢を修飾する手段としては、動物とヒトでビフィズス菌増加作用が確認されており^{47,48}、かつ成人女性⁴⁹⁻⁵³に加えて妊婦⁵⁴への投与実績のあるフラクトオリゴ糖 (Fructooligosaccharides: FOS) の投与を選択した。母親の Prebiotics 摂取の影響を確認するため、*Bifidobacterium* spp.に加えて成人で優勢な腸内細菌として *Clostridium coccooides* group、*Clostridium leptum* subgroup、*Bacteroides* spp.、and *Enterobacteriaceae* を評価した^{10,37,55}。ビフィズス菌の伝播を詳細に解析するため、乳児と成人の両方で検出され、かつ FOS と母乳オリゴ糖の両者を資化することが確認されている *Bifidobacterium longum* (*B. longum*)も評価した^{10,25,56}。さらに、母親の Prebiotics 摂取が母親の便性、便頻度、および副作用の頻度を評価した。また、研究項目 1 で検討した「Prebiotics 摂取が母乳中 sIgA 分泌に及ぼす影響」をヒトでも評価するため、生後 1 カ月時の母乳中 sIgA 濃度を評価した。

2-2. 方法

被験者および研究デザイン

当二重盲検ランダム化群間比較試験は、Ethics Committee of Chiba University に承認されており、ヘルシンキ宣言を順守して増田産婦人科(千葉県)にて実施した^{15,57}。健常な妊婦に対し

て 2009 年 9 月から 2011 年 12 月に書面にて参加同意を得た。アレルギー発症歴のある妊婦は対象とし、妊娠期高血圧症等を有する妊婦は除外した。当試験は、UMIN Clinical Trial Registry (UMIN000008142) (<http://www.umin.ac.jp/>)に登録済みである。

84 名の妊婦を無作為に FOS 群(試験食:FOS, Meioligo-P, Meiji Food Materia Company Limited) (n = 41)またはプラセボ群 (試験食:シヨ糖摂取)(n = 43)に振り分けた(Figure 2-1)。妊婦は妊娠 26 週から産後 1 か月までの間、1 日 8 g の試験食(4g を 1 日 2 回)を摂取した。試験食以外の食事からのオリゴ糖の摂取は、倫理的観点から制限しなかった。このため、日誌および食事摂取頻度調査の結果に基づいて、プラセボ群の被験者のうち、市販のオリゴ糖製品を週に 2 日以上摂取している被験者は除外した。加えて、試験食の摂取が既定の 80%を下回った被験者は、介入不十分として除外した。(Figure 2-1)

便試料の収集

便試料は通算 3 回採取した。具体的には、初回は妊娠 26 週の妊婦から、2 回目は妊娠 36 週(介入 10 週後)の妊婦から、3 回目は生後 1 ヶ月の乳児から摂取した。便は採取後すぐに冷凍し、分析時まで -20°C で保存した。

糞便中細菌叢の解析

DNA の抽出は、QIAamp stool mini kit (QIAGEN; Valencia, CA, USA)を用いて 20 mg の便から行った。なお、破碎の条件は、0.1mm と 0.3 mm のジルコニアビーズ共存下で Tissue Lyser にて 25.0 Hz 10 分間とした。

便中腸内細菌数の測定は、RT-PCR によって行った。測定対象は、*Bifidobacterium* spp.、*Bacteroides* spp.、*Enterobacteriaceae*、*Clostridium coccooides* group、*Clostridium leptum* subgroup、*Bifidobacterium longum* (*B. longum*)とし、プライマーは過去に報告されたものを用いた^{37,58}。

便性、分娩法、栄養法

便性状、排便頻度、下痢症状の有無、腹痛の有無を、妊娠 24 週、28 週、32 週、36 週に自記式調査票にて調査した。便性状は Bristol Stool Form Scale (水様~固形:1~7 のスコア)⁵⁹に基づくスコアを、下痢と腹痛の頻度は直近 1 週間の発生回数を評価した。分娩法は病院のカルテの記録を、栄養法は自記式調査票により調査した。

母乳中 IgA 濃度

第 1 項に記載の試験で採取した産後 1 ヶ月母乳中の総 IgA 濃度を測定した。母乳中総 IgA 濃度は、Human IgA ELISA Quantitation Set (BET E80-102)、ELISA Starter Accessory Package Kit I (BET E101)を用いて実施した。

解析対象からの除外

母親の便解析では、便試料の欠損により 1 名を除外した。乳児の便解析では、分娩法の影響^{60,61}を受けることを避けるため、帝王切開で生まれた乳児を除外した (FOS 群 3 名、プラセボ群 2 名)。また、便試料の欠損により 2 名を除外した。*B. longum* 数の解析では、試料の不足により、さらに 1 名の乳児を除外した。母親の便性解析では、記録が 1 週間に 3 日以下の被験者は除外した。

統計解析

集計値は、データの分布により中央値または平均値で示した。パラメトリックデータの群間比較には Student's t-test を用い、ノンパラメトリックデータの群間比較には Mann-Whitney U test を、カテゴリデータの群間比較には、chi-squared test を用いた。相関解析には、Spearman の順位相関係数の検定を用いた。 $P < 0.05$ の結果を統計学的に有意と判断した。統計解析には Bell Curve for Excel (Social Survey Research Information Co. Ltd. Japan)を用いた。

2-3. 結果

プラセボ群の 29 名、および FOS 群の 35 名を解析対象とした (Figure 2-1)。被験者の背景情報、食事習慣に群間の差は認められなかった (Table 2-1)。

介入前後の母親の便中細菌数を Figure 2-2 に示す。介入後 (妊娠 36 週) の FOS 群の便中 *Bifidobacterium* spp. の数は、 $2.7 \times 10^{10}/g$ でプラセボ群の $1.1 \times 10^{10}/g$ より有意に高値であった (Mann-Whitney U test、 $P < 0.05$ 、Figure 2-2)。同様に、介入後 (妊娠 36 週) の FOS 群の便中 *B. longum* の数は、 $2.3 \times 10^{10}/g$ で、プラセボ群の $9.7 \times 10^9/g$ より有意に高値であった (Mann-Whitney U test、 $P < 0.05$ 、Figure 2-2)。*Clostridium coccooides* については、介入前 (妊娠 26 週) の FOS 群でプラセボ群より低かったが、介入後 (妊娠 36 週) で差は認められなかった。

母親の FOS 摂取が乳児の腸内細菌叢形成に及ぼした影響の評価結果を Figure 2-3、Figure 2-4、Table 2-2 に示す。1 ヶ月齢において、乳児便中の *Bifidobacterium* spp. と *B. longum* の数に群間の差は認められなかった。両群を対象とした母子間の糞便中菌数の相関解析では、*Bifidobacterium* spp. では相関関係が認められなかったが ($\rho = 0.09$ 、 $P = 0.50$ 、Figure 2-4)、*B. longum* では有意な相関関係が認められた ($\rho = 0.33$ 、 $p = 0.01$ 、Figure 2-4)。群別のサブグループ解析では、FOS 群でのみ、*B. longum* 数の母子間の有意な正の相関関係が認められた (Table 2-2)。

母親の便性状スコア、排便頻度、腹痛、下痢の頻度を Table 2-3 に示す。排便頻度については介入 2 週間後に FOS 群でプラセボ群より有意に多く (1.0 vs 0.8 回/日、 $P < 0.05$)、その他の項目には群間の差は認められなかった。

産後 1 ヶ月母乳中の総 IgA 濃度に、群間の差は認められなかった (Figure 2-5)。

2-4. 考察

本研究では、母親の腸内菌叢の修飾が乳児の腸内細菌叢形成に影響を及ぼすかを、二重盲検ランダム化比較試験により評価した。8 g/日の FOS を摂取した母親において腸内細菌叢の修飾 (*Bifidobacterium* 属菌数の増加) が確認されたが、乳児のビフィズス菌数は増加しなかった¹⁵。これらの知見は、過去の観察研究や Prebiotics を母親に投与した試験結果とも整合性がある^{41,46,62}。一方で、サブグループ解析により、いわゆる乳児型のビフィズス菌である *B. longum* の菌数は母子間の連動性が高いことも明らかとなった。乳児のビフィズス菌主体の腸内細菌叢形成は、周産期母親の乳児型ビフィズス菌数を高めておくことで促進される可能性が示された。

本研究では、乳児のビフィズス菌主体の腸内細菌叢形成は、母親の腸内ビフィズス菌数を単純に増やすことでは促進されないことが示されたが、その理由として以下の 4 つの可能性が考えられる。1 点目は、乳児への影響が、今回評価した 1 ヶ月齢より早い段階で生じるため、検出できなかった可能性である。2 点目は、母親の Prebiotics 摂取は腸内のビフィズス菌を増やしたものの、母子伝播に最も影響する腔内菌叢までは修飾できなかった可能性である。3 点目は、母子伝播した *Bifidobacterium* 属菌が乳児の腸内細菌叢内で十分に増殖・定着できなかった可能性である⁶³。4 点目は、母子伝播した *Bifidobacterium* 属菌が遺伝的に母乳オリゴ糖を資化できなかったため、乳児の腸内で増殖できなかった可能性である。実際、新生児のビフィズス菌数は母乳オリゴ糖の資化

性に大きく影響されることが示されている⁵⁶。この4点目の可能性を検討するため、母乳オリゴ糖を資化できる菌種の代表として、*B. longum* の数を母子のそれぞれで評価した。しかしながら、*B. longum* の数は、*Bifidobacterium* 属菌数と同様に、母親での増加が確認されたが、乳児での増加は確認されなかった。これらの理由により、母親が周産期に prebiotics を摂取して自身のビフィズス菌数を高めても、乳児の腸内ビフィズス菌数が増えなかったと考えられた。

乳児のビフィズス菌主体の腸内細菌叢形成は、母親腸内の乳児型ビフィズス菌数を増やすことで促進される可能性が示された。当試験では、両群の被験者を対象とした相関解析において、いわゆる乳児型である *B. longum* 菌数の有意な母子相関が認められた (Figure 2-4)。*B. longum* は FOS と母乳オリゴ糖の両方を資化できる菌種であるために母親の FOS 摂取による腸内 *B. longum* の増加が乳児の腸内 *B. longum* 数に反映されやすかったと考えられる。一方、*Bifidobacterium* 属菌数については、母子間の相関が認められなかった (Figure 2-4)。FOS は *B. longum* 以外の *Bifidobacterium* 属菌にも資化されるが、母乳オリゴ糖は一部の *Bifidobacterium* 属菌のみが資化できる。すなわち、FOS 摂取により母親の腸内で増えた *Bifidobacterium* 属菌の大部分が母乳オリゴ糖を遺伝的に資化できなかつたために乳児の *Bifidobacterium* 属菌数に反映されにくかった可能性がある。以上の機序によって、母親の FOS 摂取を介して *B. longum* 数の母子相関は高まったが、*Bifidobacterium* 属の菌数の母子間の連動性はむしろ低下したと考えられた。乳児の腸内 *Bifidobacterium* 属菌数を効果的に増やすには、例えば、母親が母乳オリゴ糖を摂取して *B. longum* のような乳児の腸内で増殖・定着できる *Bifidobacterium* 属菌を母親の腸内で優先的に増やしておくことが有用であると考えられる。この仮説を証明するには更なる検討が必要である。

FOS には妊婦の便秘を軽減する可能性が示された。妊婦の便秘症の発症率は、11~45%といわれており⁶⁴、妊婦の QOL の低下を引き起こしている。FOS、乳酸菌、およびビフィズス菌の混合物の投与は便秘症の成人女性において排便頻度を向上させることが示されている⁵⁰。同様の効果はプロバイオティクス⁶⁵ や FOS²⁸ の投与でも観察されている。しかしながら、妊婦での排便頻度に及ぼす影響はほとんど評価されていない⁵⁴。本研究で観察された排便頻度の向上は、妊婦の便秘症を軽減する可能性を示している。今後、便秘症を有する妊婦での詳細検討が期待される。

Prebiotics 摂取が母乳中 IgA 濃度に及ぼす影響には種差が認められた。第1項において周産期マウスに FOS の一種である 1-ケストースを摂取させると母乳中 IgA 濃度が高まることを示した。一方、ヒトを対象とした当試験では、産後1ヵ月時の母乳中総 IgA 濃度は、試験群とプラセボ群で差異が認められなかった (Figure 2-5)。当試験では母親の糞便中 *Bifidobacterium* 属菌の有意な上昇が確認されていることから、腸管免疫を介して母乳中 IgA に及ぼす影響を評価するには十分

な条件であると考えられる。それにもかかわらずヒトで母乳中 IgA に影響が及ばなかった理由は不明であるが、IgG の胎盤移行性の違い(マウス:少量移行、ヒト:十分量移行)のために母乳中 IgA の重要度がマウスでより大きいことが影響している可能性が考えられる。すなわち、マウスでは胎盤移行の IgG が少ないために母子免疫伝達の媒体として母乳中 IgA を優先的に利用している一方で、ヒトでは母子免疫の媒体として母乳中の IgA の他に胎盤移行の IgG があるために母乳中 IgA 濃度に反映させる必要性が低い可能性である。この仮説を証明するには母乳と血液の免疫グロブリンを詳細に解析する必要がある。

本研究にはいくつかの限界がある。1 点目は、倫理的観点から市販のオリゴ糖の摂取を制限していない点である。このため、市販のオリゴ糖を1週間に2回以上摂取しているプラセボ群の被験者を除外した。すなわち、当試験で得られた FOS 群の結果が部分的に市販の Prebiotics の摂取の影響を受けている可能性は否定できない。2 点目は、細菌数の測定を RT-PCR 法により測定している点である。16S rRNA ベースのメタゲノム解析であれば、より包括的な評価が可能となる。

本研究では、乳児のビフィズス菌主体の腸内細菌叢形成は、母親の腸内ビフィズス菌数を単純に増やすことでは促進されないこと、および母親の腸内乳児型ビフィズス菌数を増やすことで促進される可能性が示された。

图表

Table 2-1. Characteristics of the mothers and the neonates¹⁵.

	Placebo group n = 29	FOS group n = 35	P
Mothers' characteristics			
Age (median, years)	33	30	N.S.*
Primipara (n)	13	16	N.S.†
Pollen disease (n)	8	10	N.S.†
History of atopic diseases (n)	1	6	N.S.†
History of other allergic diseases (n)	10	20	N.S.†
Smoking during pregnancy (n)	6	3	N.S.†
BMI during prepregnancy (median, kg/m ²)	21.2	20.3	N.S.*
BMI during pregnancy (median, kg/m ²)	25.3	24.6	N.S.*
Neonates' characteristics			
Fetus week number (median, weeks)	39.1	39.3	N.S.*
Birth weight (median, g)	2990	3165	N.S.*
Caesarean section (n)	2	3	N.S.†
Exclusively breastfed (n)	14	16	N.S.†
Partially breast-fed (n)	15	19	N.S.†

FOS, fructo-oligosaccharides.

* Mann-Whitney U-test.

† Pearson's χ^2 test

Table 2-2. Subgroup analysis for relation between the number of fecal bifidobacteria in mothers and their neonates¹⁵.

Subgroup	<i>Bifidobacterium</i> spp.			<i>B. longum</i>			
	n		P	n		P	
Placebo-group	All infants	25	0.19	0.37	25	-0.22	0.25
	exclusively breastfed infants	13	0.41	0.16	13	0.14	0.64
FOS-group	All infants	31	-0.02	0.94	30	0.49	0.01
	exclusively breastfed infants	16	0.15	0.56	16	0.40	0.17

Table 2–3. Stool characteristics and adverse events recorded in pregnant women 2 weeks before the intervention and 2, 6, and 10 weeks after the intervention¹⁵.

Weeks of gestation	24		28		32		36	
	-2		2		6		10	
Weeks from the start of supplementation								
Group	Placebo	FOS	Placebo	FOS	Placebo	FOS	Placebo	FOS
n	25	27	26	31	24	33	25	32
Stool frequency (times per day), median	0.9	1.0	0.8	1.0*	1.1	1.0	1.2	1.0
Stool form score, mean	3.9	4.2	3.9	4.2	3.9	4.0	3.9	4.3
Frequency of abdominal pain (days per week), median	0	0	0	0	0	0	0	0
frequency of diarrhea (days per week), median	0	0	0	0	0	0	0	0

P = Placebo-group, F = Fructooligosaccharides-group

* $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test)

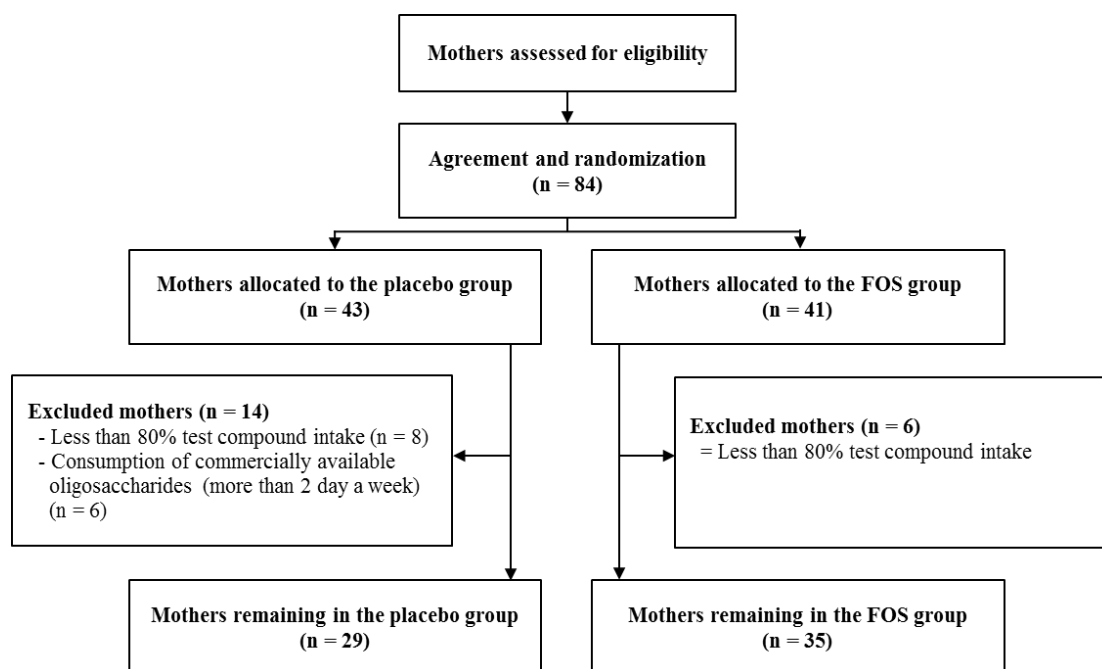


Figure 2-1. Diagram showing the flow of participants in the placebo and FOS groups¹⁵.

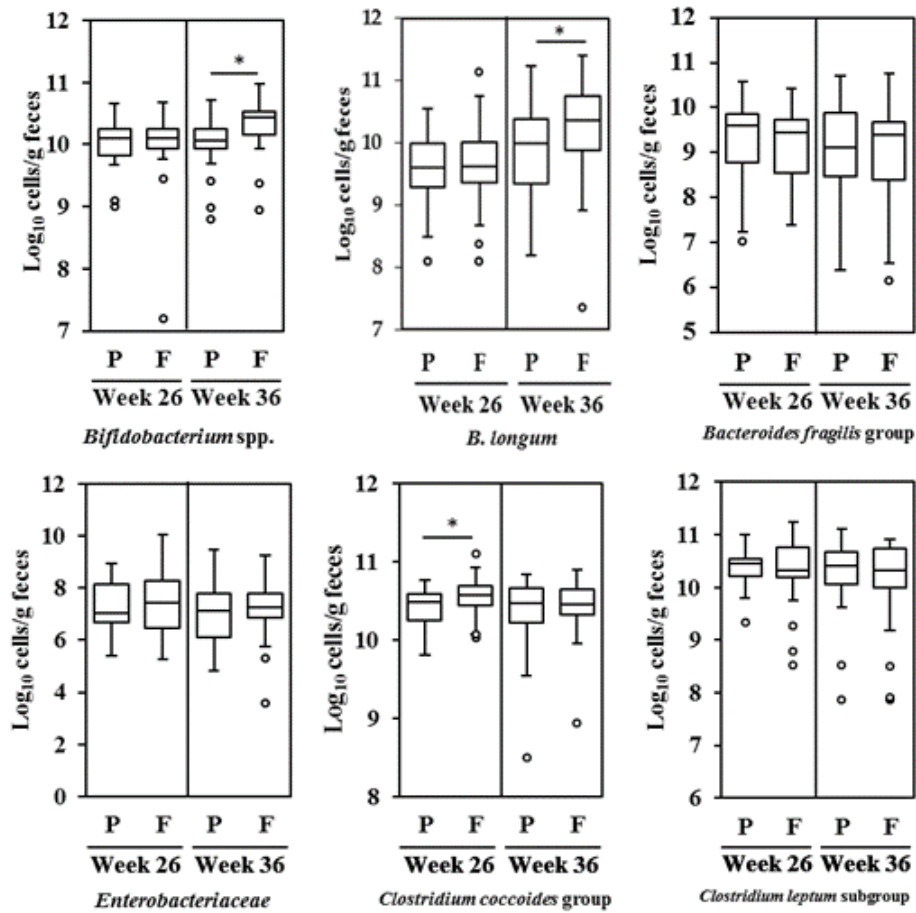


Figure 2-2. The number of gut microbiota, expressed as the logarithm of cell numbers, in maternal feces at 26 and 36 weeks of gestation¹⁵. Microbiota were quantified using q-RT-PCR (n = 29 and 34 for the placebo and FOS group, respectively). Box and whiskers plot, with the black horizontal line representing the median value and the boxes the interquartile ranges. The T-bars represent the data range, and the open circles indicate the presence of outliers (data points more than 1.5 interquartile ranges below the first quartile or above the third quartile). *Statistically different based on a Mann-Whitney U test ($P < 0.05$). P: Placebo group; F: FOS group.

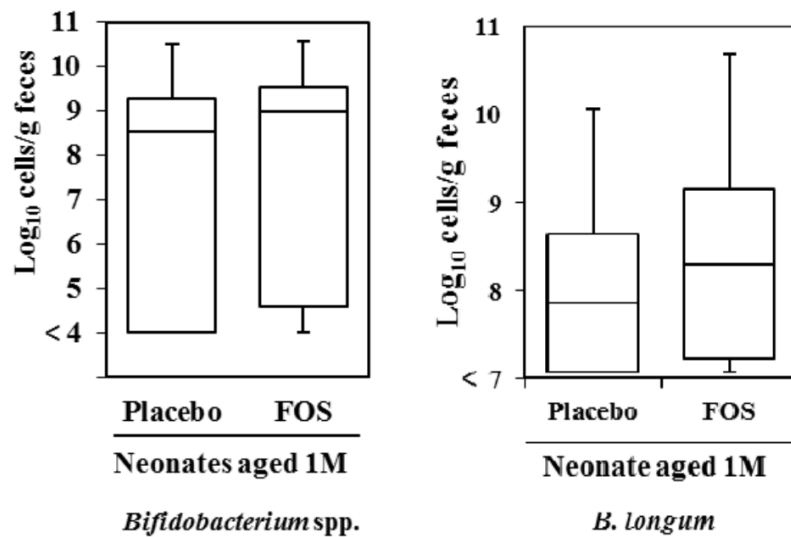


Figure 2–3. Figure 3. Infant fecal *Bifidobacterium* spp. and *B.longum* at one month of age, excluding neonates born by C-section¹⁵. The number of *Bifidobacterium* spp. was quantified using q-RT-PCR (n= 25 and 30 in the analysis of *B.longum*) for the placebo and FOS group, respectively). Box and whiskers plot, with the black horizontal line representing the median value and the boxes the interquartile ranges. The T-bars represent the data range, and the open circles indicate the presence of outliers (data points more than 1.5 interquartile ranges below the first quartile or above the third quartile). No significant difference was observed between the groups (Mann-Whitney U test).

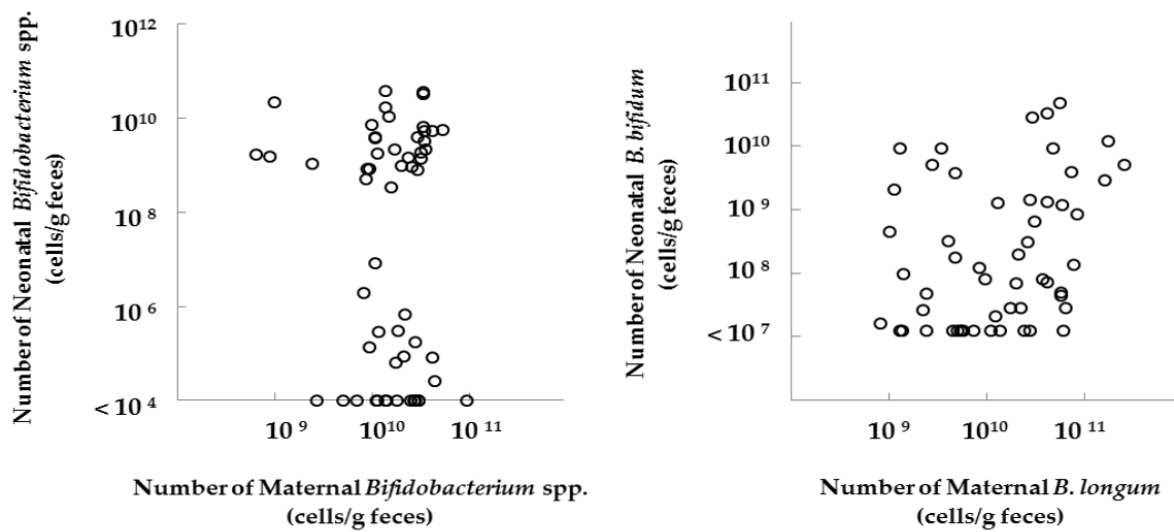


Figure 2-4. Relations between the number of fecal (A) *Bifidobacterium* spp. or (B) *B. longum* in mothers (at 36 weeks of gestation) and their neonates (1 month after delivery), excluding neonates born by C-section¹⁵. The number of *Bifidobacterium* spp. was quantified using q-RT-PCR (n = 25 and 31 in placebo and FOS group, respectively). Data were analyzed using the Spearman's rank correlation coefficient (A: $\rho = 0.09$, P = 0.50; B: $\rho = 0.33$, P = 0.01).

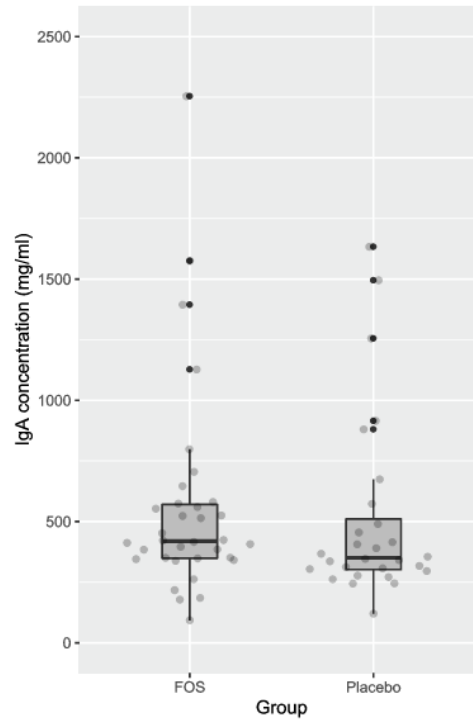


Figure 2-5. IgA concentration in breastmilk at 1 month after delivery in placebo and FOS groups.

Removed 1 sample in FOS group with IgA concentration of >2,500 mg/mL

3. タンパク質含量を低減した乳児用調製乳の乳児発育への影響

3-1. 緒言

乳児用調製乳の栄養組成が適切であることを確認するためにはその乳児用調製乳を摂取した乳児の発育を確認することが望ましいことを、Scientific Committee on Food (SCF) 等は指摘している⁶⁶⁻⁶⁸。しかし、現実に発育評価を行った事例は限られているのが実情である。

乳児期のタンパク質摂取は乳児期の発育、および将来の健康に直接的に影響し得る。乳児が適切に成長するためには、過不足のない量と質のタンパク質を摂取する必要がある⁶⁹⁻⁷²。タンパク質の摂取不足は、発育不良に直結する。一方でタンパク質の過剰摂取は、腎臓・肝臓等の臓器への過負荷のリスクを高め、また、代謝調節への過剰刺激のリスクも高め得る。さらに乳児期におけるタンパク質の過剰摂取は、成長後の健康状態や肥満・高血圧等の疾病の発症に影響を及ぼす可能性 (Developmental Origin of Health and Disease; DOHaD 仮説) も明らかにされつつある^{19,73,74}。したがって、乳児用調製乳のタンパク質含量を変更した時はその乳児用調製乳を摂取した乳児の発育を評価することが強く望まれる。

乳児の成長・発達におけるドコサヘキサエン酸 (DHA) とアラキドン酸 (ARA) の摂取の重要性への注目が高まっている。乳児期は、DHA および ARA が急速に脳に蓄積される時期である^{75,76}。しかしながら、DHA、ARA の生合成能が低いため⁷⁷、母乳やミルクから摂取した DHA と ARA が重要な役割を果たしていると考えられる。これまでに、脳の容積は頭囲と相関すること⁷⁸⁻⁸⁰、および乳児期の DHA・ARA の摂取状況が頭囲の成長と関連することが示されていることに加えて⁸¹、DHA・ARA の摂取および頭囲の成長のそれぞれが幼児期の視覚・認知機能に影響し得ることが示されている^{20,21,78,79}。以上のことから、乳児期の DHA と ARA の摂取は、乳児期およびそれ以降の成長・発達に影響を及ぼし得る重要な要素であると考えられる。

日本で市販されている乳児用調製乳 A では、タンパク質含量を 2.3 g/100 kcal から 2.2 g/100 kcal に低減し、母乳の平均値 (1.9±0.43 g/100 kcal) に近づけている¹⁷。ARA 濃度は、5.1 mg/100 kcal (乳児用調製乳 B) から 13.2 mg/100 kcal に増量し、DHA 濃度は 20 mg/100 kcal を維持した。すなわち、乳児用調製乳 A の DHA と ARA の濃度は、いずれも母乳と同等量となっている (母乳中の DHA および ARA の濃度 (平均値±標準偏差の範囲) はそれぞれ 13-24 mg/100 kcal、19-66 mg/100 kcal)¹⁷。そこで、乳児用調製乳 A の哺乳が乳児の発育に及ぼす影響を明らかにするための乳児発育調査研究を実施した

3-2. 方法

被験者および研究デザイン

当観察研究は、Meiji Institutional Review Board (Approval No.32)に承認されており、ヘルシンキ宣言を順守して実施した。参加者の保護者に対して研究エントリー時(1 か月健診時)に書面にて参加同意を得た。本研究では、University Hospital Medical Information Network (UMIN) Clinical Trial Registry (UMIN000023110; <http://www.umin.ac.jp/>)に登録済みである。

15-59 日齢で母乳または保護者により購入された乳児用調製乳 A(株式会社 明治、東京、日本)を哺乳していた乳児を 2014 年 9 月 1 日~2016 年 3 月 31 日の期間で全国の病産院でエントリーし(n = 1,053)、12 ヶ月齢まで追跡した。この間、4 時点で自記式調査票による調査を実施した(エントリー時の 15-59 日齢、90-149 日齢、180-239 日齢、および 330-389 日齢)。これらの期間は一般的に乳児の定期健診が行われているため、正確な身体測定値が得られる。研究参加の継続意欲を高めるため、調査票は育児グッズとともに自宅に送付された。

乳児用調製乳 A の栄養組成

本研究で評価対象とした乳児用調製乳 A の栄養組成を Table 3-1 に示した。

調査項目

本研究では、自記式調査票を用いて乳児の性別、在胎週数、分娩方法、疾患の有無、身体測定値(体重、身長、頭囲)に関するデータを得た。さらに、15-59 日齢(1 ヶ月)、90-149 日齢(4 ヶ月)、180-239 日齢(7 ヶ月)、および 330-389 日齢(12 ヶ月)に、身体測定値、1 日分の哺乳記録、便性状、健康状態に関するデータを得た。なお、身長、頭囲は測定誤差を生じやすいため、医療関係者による測定値のみを収集した(母子手帳に記録された健診時の測定値を調査票に転記)。

発育・便性状・健康状態

評価対象者は、先天性疾患無し、満期産(在胎週数 37 週以上)、出生体重 2500-4000 g、および 7 ヶ月齢時までの間、体重データの欠損がない児とした。乳児の栄養法は、乳児用調製乳からのエネルギー摂取量を基準に判定した。母乳栄養は「乳児用調製乳の摂取がないこと」と定義した。人工栄養は「0.5-1 ヶ月齢で 123 kcal/kg/day、1-2 ヶ月齢で 115 kcal/kg/day、3-4 ヶ月齢で 82 kcal/kg/day、4 ヶ月齢以降で 76 kcal/kg/day を超えるエネルギーを乳児用調製乳から摂取していること」とした。なお、これらのエネルギー摂取量は、完全人工栄養児の平均摂取量の 90%に相当す

る値である⁸²。

体重、BMI、頭囲の評価にあたっては、15-59 日齢(1 カ月)、90-149 日齢(4 カ月)、180-239 日齢(7 カ月)のすべての調査時期において、母乳栄養であった児を母乳栄養児とし、人工栄養であった児を乳児用調製乳 A 児として両者を比較した。さらに、これらの乳児用調製乳 A 児と母乳栄養児のうち 12 カ月までのフォローアップを完了した乳児について、12 カ月齢の体重、BMI、頭囲を比較した。便性状は、乳児便スケール⁸³を一部改変して評価した。具体的には、水様、柔らかい、有形~固形の 3 段階で評価した。38°C 以上の発熱、および各疾患(医師の診断^{*1})の発生率(6 カ月齢までの通算、12 カ月齢までの通算)を比較した。

*1 中耳炎、インフルエンザウイルス感染、ロタウイルス感染、湿疹、食物アレルギーまたはアトピー性皮膚炎

統計解析

サンプルサイズは、過去に発表された体重を評価項目とする研究に基づいて決定した⁸⁴⁻⁸⁶。これらの研究では、1 群 55 名以上のサンプルサイズにより統計学的に十分な検出力を有することが示されている。FDA のガイドラインでは、体重評価の際は各性別 28 名以上を研究に組み入れる必要性が示されている⁸⁷。以上より、乳児用調製乳 A 児と母乳栄養児がそれぞれ 56 名以上となることが望ましいと考えられた。当観察研究では、40%の追跡調査脱落、20%の栄養法変更を許容できる水準として、134 名の乳児用調製乳 A 児を 1 カ月齢でエントリーした。

得られた結果の集計値は、平均値(標準偏差)または中央値で示した。2 群間の比較は、数値の属性・分布等を考慮して、Student's t-test、two-way ANOVA with repeated measures、chi-squared test、または Fisher's exact test を、3 群間の比較は Tukey-Kramer test を用いた。2 変数の相関の解析には、ピアソンの相関係数を用いた。すべての検定について、 $P < 0.05$ の比較結果を有意とした。統計解析は、Bell Curve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて行った。

3-3. 結果

394 名(295 名の母乳栄養児と 99 名の乳児用調製乳 A 児)名が解析対象に適合した(Figure 3-1)。被験者の背景情報を Table 3-2 に示す。

発育指標の 7 カ月齢までの評価結果を Figure 3-2 (a-c)に示す。いずれの項目とも、2

元配置分散分析において、時間(月齢)の効果が有意であったが、栄養法の効果および交互作用は認められなかった。同様に、両グループ間の体重増加率にも差は認められなかった[ミルク A 男児:25.6 (4.0) g/day、母乳栄養男児:24.9 (4.1) g/day、ミルク A 女児:22.9 (5.3) g/day、母乳栄養女児:22.3 (3.7) g/day]。12 カ月フォローアップ時も同様に、身体測定値のグループ間の差は認められなかった(Figure 3-3)。

乳児用調製乳 A 児と母乳栄養児の便性状について、1、4、7カ月のすべての時点において有意な差は認められなかった (Figure 3-2(d))。

乳児用調製乳 A 児と母乳栄養児の感染症・アレルギー等の発症経験率について 6 カ月齢まで、および 12 カ月齢までのいずれにおいても有意な差は認められなかった(Table 3-3)。

3-4. 考察

本研究では、1053 名の乳児の体重・BMI・頭囲等の指標を生後から 12 カ月齢まで追跡調査し、乳児用調製乳 A 栄養児の発育が母乳栄養児と同様で適切であることを明らかにした¹⁸。乳児用調製乳 A で刷新された「タンパク質」と「DHA・ARA」は乳児期およびその後の成長・発達に影響を及ぼし得る栄養素であるが、これらを含む乳児用調製乳 A の栄養組成は乳児の発育の観点で適切であることが示された¹⁸。

タンパク質含量 2.2 g/100 kcal のミルク A を哺乳した乳児のタンパク質摂取量は、適切であることが示された。乳児において、牛乳タンパク質の利用効率は 70%であり、母乳中タンパク質の利用性と同等であることが示されている⁸⁸。本研究では、乳児用調製乳 A 児のタンパク質摂取量が母乳栄養児より高いこと、および乳児用調製乳 A 児の発育が母乳栄養児と同等であることを確認した(Figures 3-2 and 3-3)。加えて、乳児用調製乳 A 児の発育は WHO や厚生労働省が提示する標準成長曲線に沿っていた。したがって、乳児用調製乳 A 児においてタンパク質摂取量が不足している可能性は極めて低いと考えられた。ところで、過去の研究ではタンパク質摂取量が多すぎる場合に、BMI が生後 6 カ月で高値となり、5 歳時の腹膜前脂肪の過剰蓄積を引き起こしたことが報告されている^{73,89}。本研究では、乳児用調製乳 A 児と母乳栄養児の BMI は、生後 7 カ月および生後 12 カ月まで差がないことが確認されたことから、乳児用調製乳 A 児においてタンパク質摂取量は過剰ではないと考えられた。これらの知見は、乳児用調製乳 A から摂取するタンパク質量が不足も過剰もない適切な量であることを示している。

乳児用調製乳 A でタンパク質の「量」を低減しながらも適切な発育が得られたことには、乳

児用調製乳のタンパク質の「質」の改善が寄与している可能性も考えられる。タンパク質設計で最も重要な要素の 1 つは個々のアミノ酸の量である。特に必須アミノ酸の量は、万が一にも不足してはならない。加えて、Arg と His は、乳児期において必須性の高いアミノ酸であり、かつ、一般的な乳タンパク質原料の組み合わせでは供給されにくいアミノ酸でもあるため、乳児用調製乳のタンパク質を減量する場合には注意が特に必要である。乳児用調製乳 A では、これらのアミノ酸の含量が Table 3-1 に示したように母乳中含量と同等以上になるように設計している。タンパク質のアミノ酸への消化性の観点では、胃内での物性(ひいては胃排出速度)に影響するカゼインの量を母乳に近づけ、ヒト母乳に含まれず比較的消化されにくい β ラクトグロブリンを低減し、消化されやすい α -ラクトアルブミンの比率を高めている。さらに、未分解の「タンパク質」の量を母乳に近づけることで消化管機能発達にも配慮している⁹⁰。このように、タンパク質を減量する際は、乳児用調製乳のタンパク質の「質」をあわせて考慮することが欠かせない。乳児用調製乳 A のタンパク質の設計 (Table 3-1、Figure 3-4)は、乳児の体重、BMI および便性の評価により、「量」に加えて「質」の観点でも妥当であると考えられた。

乳児用調製乳 A のタンパク質設計は、消化・吸収の観点でも適していることが示唆された。乳児では、母乳栄養でも人工栄養でも摂取したタンパク質の 30%が利用されずに排出される⁸⁸。しかし、タンパク質の量または質が乳児用ミルクと母乳とで大きく異なっていれば、大腸に流入する窒素成分残渣に差異が生じて便性状が変わる可能性があることから、便性状は消化・吸収の有用な評価指標であるといえる。当調査では、乳児用調製乳 A 栄養児の便性状が母乳栄養児と近似していたことから (Figure 3-2)、乳児用調製乳 A で減量されたタンパク質の量 2.2 g/100kcal と質は、消化・吸収の観点で乳児に適していると考えられた。

頭囲の成長が適正だったことには乳児用調製乳 A の DHA と ARA の適切な設計が寄与している可能性が考えられた。脳容積と相関する頭囲について⁷⁸⁻⁸⁰、乳児用調製乳 A 栄養児と母乳栄養児は生後 12 か月まで同等に成長していた (Figures 3-2 and 3-3)。さらに、WHO や日本の標準成長曲線に沿っていた。乳児期の DHA・ARA 摂取に関しては、これらの摂取がどちらか一方に偏ることを避けた方がよいことを示唆する複数のエビデンス^{21,81,91}：例えば、血中 ARA 濃度は DHA のみを摂取した場合にいずれも摂取しなかった場合より低下したこと、視覚機能・認知機能発達は、DHA と ARA の両方を摂取した方が DHA のみを摂取した場合より優れていたこと等が示されている。これらの知見からも、乳児用調製乳 A (DHA: 20 mg/100kcal、ARA: 13.2 mg/100kcal) から摂取する DHA、ARA の量は適切であると考えられた。

乳児用調製乳 A 児の感染およびアレルギーの発症頻度は母乳栄養児と差がないことが

確認された。乳幼児期の代表的な感染症の1つである中耳炎の発症率に関して、過去の報告では人工栄養児で発症率が高いとする報告⁹²、およびその要因を哺乳瓶の使用とする報告がある⁹³。しかしながら、少なくとも当調査では、乳児用調製乳A児と母乳栄養児の中耳炎の発症率に差はみられなかった(Table 3-3)。日本では、中耳炎の原因菌である肺炎球菌ワクチンの接種が公費で受けられるため、今回調査した乳児のほとんどが肺炎球菌ワクチンを接種していると推察される。肺炎球菌の予防接種は中耳炎の発症率を低下させることが示されていることから⁹⁴、乳児用調製乳A児での哺乳瓶の使用による中耳炎の発症を抑制できているのかもしれない。また、食物アレルギー・アトピー性皮膚炎の発症についても、乳児用調製乳A児と母乳栄養児に差はみられなかった(Table 3-3)。当調査では、医師に診断に基づいた発症率を評価しているが、“Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy”が2016年に改訂されたため⁹⁵、診断基準が当調査の期間内で統一されていない可能性がある。とはいえ、当調査で得られた結果は、「母乳栄養によるアレルギー疾患予防についての十分なエビデンスはない。」とする学会見解に沿うものであった⁹⁶(JPGFA2016)。上記を含む健康状態に関するすべての評価項目で栄養法による差は認められなかったことは乳児用調製乳A児の健康状態が良好であったことを示唆している。

本研究にはいくつかの限界がある。1点目は、観察研究であるため、常に未知の交絡因子の影響を受けている可能性があり、それらを考慮できないということである。2点目は自記式調査票を用いてデータを得ていることである。3点目はフォローアップの脱落やデータ欠損による選択バイアスがあることである。これらの手法上の限界は、結果の過大評価や過小評価の要因となり得る。

本研究では、乳児用調製乳A栄養児のBMIを含む発育指標が母乳栄養児と同等であったことから、乳児用調製乳A栄養児のタンパク質摂取量は適正であることが示された。加えて、低減したタンパク質を含む乳児用調製乳Aの栄養組成は、乳児の発育に適していることが確認された。健常乳児を対象とした介入的試験は倫理面を考慮すると実施が困難であるため、本研究のような観察研究の積み重ねが将来の乳児栄養の改良に寄与すると考えられる。

图表

Table 3-1. Protein, Fat, and Carbohydrate composition of Formulas A and B¹⁸.

	per 100 kcal		
	Formula A	Formula B ⁹⁷	Breast milk ¹⁻³
Protein⁴, g	2.2	2.3	1.47-2.33
Fat, g	5.16	5.13	4.2-6.6
Arachidonic acid ⁴ , mg	0.013	0.0051	0.013-0.024
Docosahexaenoic acid ⁴ , mg	0.02	0.02	0.019-0.066
Carbohydrate, g	11.4	11.4	8.9-13.9
Fructo-oligosaccharides, g	0.4	0.4	N/A
Amino acid			
Isoleucine, mg	124	126	66-114
Leucine, mg	216	216	128-224
Lysine, mg	182	175	86-150
Methionine + Cystine, mg	88	82	49-87
Phenylalanine + Tyrosine, mg	173	160	95-173
Threonine, mg	131	130	57-103
Tryptophan, mg	37	40	21-43
Valine, mg	137	135	72-124
Histidine, mg	60	62	36-70
Arginine, mg	60	66	43-79

1 Japanese breast milk composition based on Yamawaki N (2005)¹⁷

2 Range from the mean minus standard deviation to the mean plus standard deviation

3 Mean and standard deviation of docosahexaenoic acid in breastmilk were geometrically calculated.

4 For commercially available infant formulas other than Formula A in Japan, the concentrations of protein, arachidonic acid, and docosahexaenoic acid are 2.15-2.38, 0-0.008 and 0-0.014 g/100 kcal, respectively.

Table 3-2. Baseline characteristics of Formula A-fed and breast-fed infants¹⁸.

	Boys		Girls	
	Formula A-fed	Breast-fed	Formula A-fed	Breast-fed
n	47	155	52	140
Gestational age, weeks	39.5 ± 1.0	39.5 ± 1.1	39.4 ± 1.2	39.7 ± 1.0
Cesarean section, n (%)	10 (21%)	19 (12%)	12 (20%) [†]	12 (9%)
Birth weight, kg	3.14 ± 0.33	3.16 ± 0.31	3.01 ± 0.34 [†]	3.13 ± 0.33
Body mass index, kg/m ²	12.6 ± 0.9	12.6 ± 0.9	12.4 ± 1.0	12.5 ± 1.0
Head circumference, cm	33.7 ± 1.3	33.8 ± 1.9	33.1 ± 1.4	33.3 ± 1.3

[†] $P < .05$ based on a Fisher's exact test or a Student's t test (vs. breast-fed group)

Table 3-3. The number of infants who experienced fever, infections, and allergies¹⁸.

	0 to 6 months		0 to 12 months	
	Formula A-fed	Breast-fed	Formula A-fed	Breast-fed
n	99	295	74	238
Fever (>38 ° C)	22 (22%)	66 (22%)	45 (61%)	166 (70%)
Otitis media	1 (1%)	8 (3%)	4 (5%)	31 (13%)
Influenza virus	2 (2%)	6 (2%)	4 (5%)	15 (6%)
Rotavirus	0 (0%)	2 (1%)	0 (0%)	4 (2%)
Eczema	26 (26%)	99 (34%)	30 (41%)	106 (45%)
Food allergy or atopic dermatitis	4 (4%)	11 (4%)	10 (14%)	45 (19%)

No differences were observed in the prevalence based on Fisher's exact test.

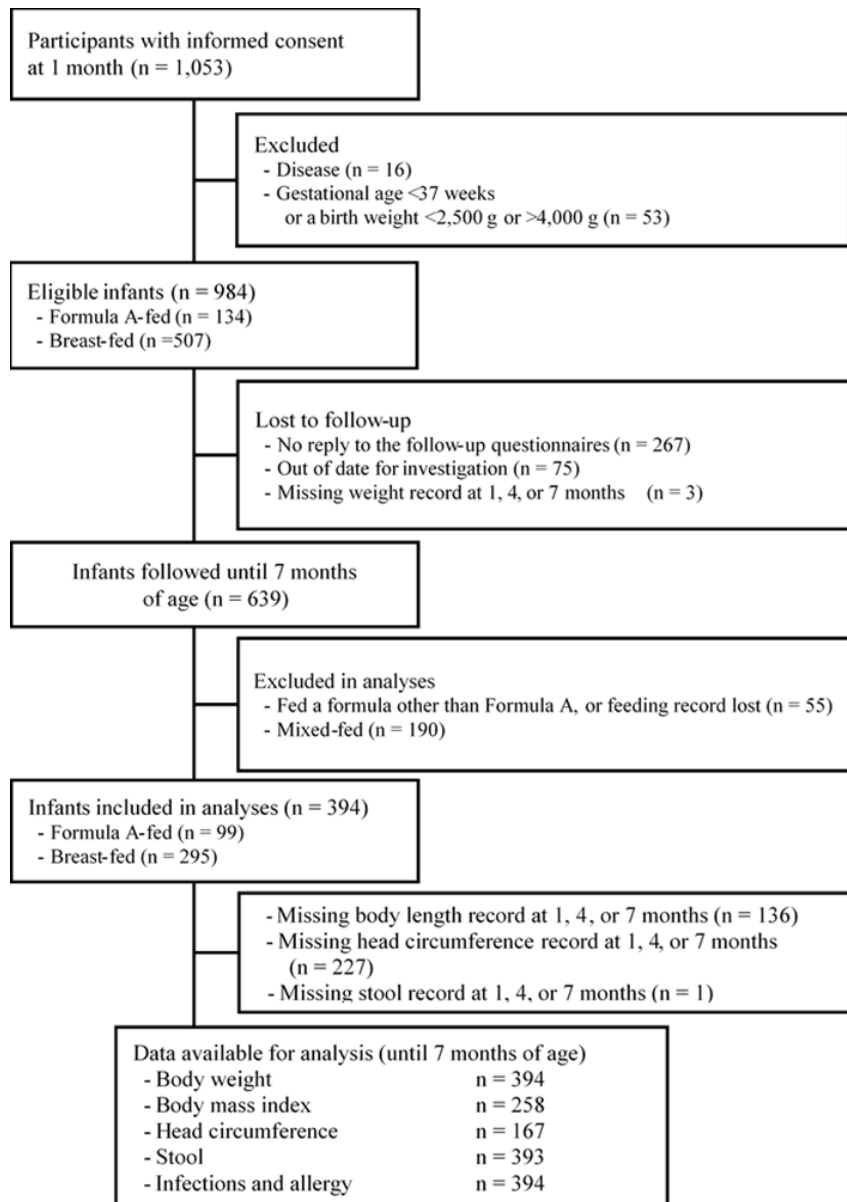


Figure 3-1. Flowchart of the analysis design¹⁸.

BMI, body mass index; HC, head circumference

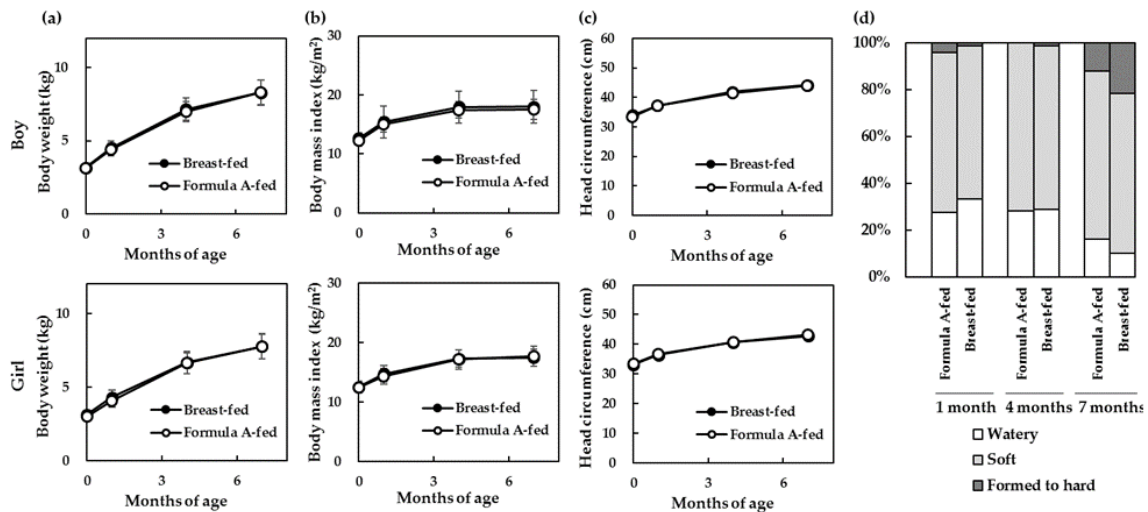


Figure 3-2. (a) Body weight, (b) body mass index, (c) head circumference, and (d) stool consistency up to 7 months of age¹⁸. Two-way ANOVA with repeated measures showed a significant time-dependent effect ($P < .05$), but no group-dependent effects or group-by-time interaction effects in any of the growth measurements. Stool consistency were rated on 3 grades (watery, soft, and formed to hard). No differences between groups were observed at 1, 4, and 7 months of age (using a chi-squared test).

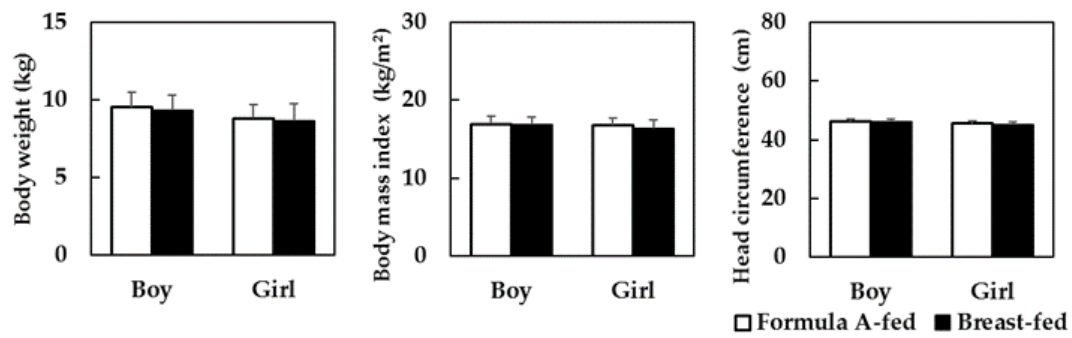


Figure 3-3. A follow-up of body weight, body mass index, and head circumference at 12 months of age¹⁸. The numbers of Formula A-fed and breast-fed infants are as follows: body weight in boys (n = 40 and n = 121) and in girls (n = 34 and n = 114), BMI in boys (n = 28 and n = 81) and in girls (n = 22 and n = 76), and health status in boys (n = 21 and n = 58) and in girls (n = 15 and n = 51), respectively. No differences were observed in any growth measurements at the 12-month follow-up based on a Student's t-test.

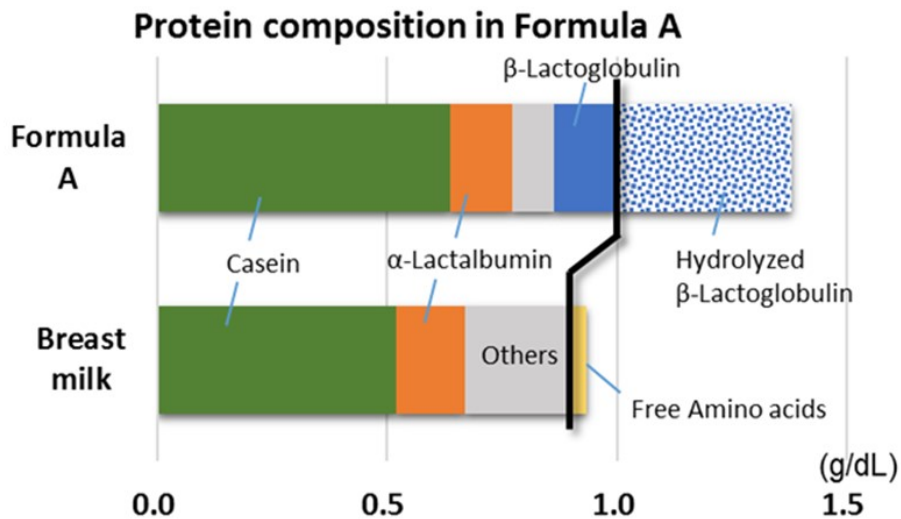


Figure 3-4. Protein composition of commercial infant formula A.

4. 乳児用調製乳の栄養組成と乳児による摂取量との関連

4-1. 緒言

乳児は、生命維持のために消費される分に加えて、急速な成長に見合う量のエネルギーを過剰も不足もなく摂取する必要がある。母乳栄養児は、過不足の無い量のエネルギーを母乳から摂取していると考えられている⁹⁸。人工栄養児は、「エネルギー摂取量が過多になっている」^{99,100}ことや、「体重増加が速い」¹⁰¹⁻¹⁰³ことが報告されており、その一因として乳児用調製乳の容積あたりのエネルギー含量が高い場合に乳児がエネルギーを過剰に摂取してしまう可能性が指摘されている¹⁰⁴。一方で、私たちはこれまでに乳児用調製乳のエネルギー濃度が異なってもエネルギー摂取量は一定に保たれることを示唆するデータを得ている^{22,105}。母乳の栄養組成には大きな個人間差や個人内差があるにもかかわらず、母乳栄養児のエネルギー摂取量が適切に保たれていることから、「乳児の1日のエネルギー摂取量は、1回のエネルギー摂取量以外の要因、例えば哺乳間隔の増減によって一定に保たれている」と考えられるが、これらを検証した研究はこれまでにない。

乳児期の成長やその予後に乳児期のタンパク質栄養が直接的に影響し得ることは本論文第3項の緒言で述べた通りである。乳児が適切に成長するためには、過不足のない量と質のタンパク質を摂取する必要がある⁶⁹⁻⁷²。タンパク質の摂取不足は、発育不良に直結する。一方でタンパク質の過剰摂取は、乳児の腎臓・肝臓等の臓器への負担リスクを高め、また、代謝調節への過剰刺激のリスクも高め得る。さらに乳児期におけるタンパク質の過剰摂取は、成長後の健康状態や肥満・高血圧等の疾病の発症に影響を及ぼす可能性(Developmental Origin of Health and Disease; DOHaD 仮説)も明らかにされつつある^{19,73,74}。したがって、乳児用調製乳のタンパク質含量は、過不足の無い適正な量であることが極めて重要である。

乳児が乳児用調製乳から摂取するエネルギーや栄養成分の量は、乳児用調製乳の栄養組成と、変動要因である哺乳量(摂取量)の主に2つの要因で決まる。栄養組成に関しては、例えば単純に母乳の主要栄養素(タンパク質、脂質、糖質)の組成に合わせて母乳と同じ量を摂取しても、アミノ酸や脂肪酸の組成が異なるため母乳と同等の栄養を必ずしも得られるわけではない。もう一方の要因である哺乳量(摂取量)に関しては、乳児間の個人差が必ず生じる。以上より、「哺乳量の決定因子の解明・検証」は乳児栄養の進展のための重要課題であるといえる。

そこで、乳児用調製乳の哺乳量に関する調査を日本で実施し、人工栄養児のエネルギーとタンパク質の摂取量を、食事摂取基準値や母乳栄養児の推定栄養摂取量との比較により評価した。さらに、乳児の「乳摂取量」に影響を及ぼす因子を明らかにするため、乳児用調製乳 A の摂取

量のデータを、異なる組成の乳児用調製乳を用いて過去に実施した2回の調査研究データとも比較しつつ、1回あたりの哺乳量および哺乳間隔と摂取エネルギーとの関係を解析した。

4-2. 方法

被験者および研究デザイン

当観察追跡研究は、Meiji Institutional Review Board (Approval No.32)に承認されており、ヘルシンキ宣言を順守して実施した。参加者の保護者に対して研究エントリー時(1か月健診時)に書面にて参加同意を得た。本研究では、University Hospital Medical Information Network (UMIN) Clinical Trial Registry (UMIN000023110; <http://www.umin.ac.jp/>)に登録済みである。

15-59日齢で母乳または保護者により購入された乳児用調製乳 A(株式会社 明治、東京、日本)を哺乳していた乳児を2014年9月1日~2016年3月31日の期間で全国の病産院でエントリーし、12ヵ月齢まで追跡した。この間、4時点で自記式調査票による調査を実施し(エントリー時の15-59日齢、90-149日齢、180-239日齢、および330-389日齢)、乳児の性別、在胎週数、分娩方法、疾患の有無、出生時および調査時の身体測定値(体重、身長、頭囲)、乳児用調製乳の摂取量に関するデータを得た。これらの期間は一般的に乳児の定期健診が行われているため、正確な身体測定値が得られる。研究参加の継続意欲を高めるため、調査票は育児グッズとともに自宅に送付された。

乳児用調製乳 A、B、および C の栄養組成

本研究で評価対象とした乳児用調製乳 A と、比較対象として用いた乳児用調製乳 B、C の栄養組成を Table 4-1 および Table 4-2 に示した。乳児用調製乳 B と C に関するデータは、過去に報告済みのものである^{97,105,106}。

乳児用調製乳およびエネルギー・各栄養素の摂取量

離乳食からの栄養摂取の影響がほとんどないと考えられる149日齢までの乳児のデータを用いて行った。評価対象者は、先天性の疾患無し、満期産(在胎週数37週以上)、出生体重2500-4000g、および調査票提出時に乳児用調製乳 A のみを哺乳していた乳児とした。15-59日齢の乳児のデータは15-29日齢(0.5-1ヵ月)と30-59日齢(1-2ヵ月)に分割し、90-149日齢の乳児

のデータは 90-119 日齢(3-4 ヶ月)と 120-149 日齢(4-5 ヶ月)に分割した。

乳児用調製乳の摂取容量は、調乳量(記録値)から飲み残し量(記録値)を差し引くことで算出した。エネルギーと各栄養素の摂取量は、乳児用調製乳のエネルギーおよび栄養素の濃度に哺乳量を乗ずることで算出した。エネルギー摂取量の評価は、Food and Agriculture Organization (FAO) が示す推定エネルギー必要量との比較により行った¹⁰⁷。タンパク質摂取量の評価は、母乳栄養児のタンパク質摂取量との比較により行った⁶⁶。18 種の微量栄養素の摂取量の比較は、World Health Organization (WHO)が示す recommended nutrient intake (RNI)との比較により行った¹⁰⁸。

乳児用調製乳 A の哺乳データを乳児用調製乳 B/C の哺乳データと比較するにあたっては、90-149 日齢のデータのみを用いた。1 日のエネルギー摂取量、1 回あたりの哺乳量、1 回あたりのエネルギー摂取量、哺乳間隔、1 日のタンパク質摂取量を、調査票の記録から算出して 3 グループ間で比較した。哺乳間隔は 24 時間を 1 日当たりの哺乳回数で除することで算出した。

統計解析

得られた結果の集計値は、平均値(標準偏差)または中央値で示した。2 群間の比較は、数値の属性・分布等を考慮して、Student's t-test、two-way ANOVA with repeated measures、chi-squared test、または Fisher's exact test を、3 群間の比較は Tukey-Kramer test を用いた。2 変数の相関の解析には、ピアソンの相関係数を用いた。すべての検定について、 $P < 0.05$ の比較結果を有意とした。統計解析は、Bell Curve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて行った。

4-3. 結果

解析対象は、15-29 日齢で 29 名、30-59 日齢で 149 名、90-119 日齢で 68 名、および 120-149 日齢で 132 名の乳児用調製乳 A 児とした(Figure 4-1)。これらの被験者の背景情報を Table 4-3 に示した。

乳児用調製乳 A 児の 1 日の乳摂取量、エネルギー・タンパク質の摂取量を Table 4-3 に、他の 18 種の栄養成分の摂取量を Table 4-4 に示す。乳児用調製乳 A 児のタンパク質摂取量は 11.4-13.3 g/日で母乳栄養児(8.8-10.8 g/日)より高かった(Table 4-3)。エネルギー摂取量は 15-149 日齢で 86-128 kcal/kg/day で FAO が示した推定エネルギー必要量と同水準であった(Table 4-3)。ビオチンとヨウ素の平均摂取量は WHO が示す RNI に届いていなかった(Table 4-4)。他の

微量栄養素の摂取量は、それぞれの RNI を上回っていた (Table 4-4)。

乳児用調製乳 A、B、および C の哺乳パターンを Table 4-5 および Figure 4-2 に示す。1 日エネルギー摂取量と 1 回哺乳量は、3 グループ間で差が無かった。1 回エネルギー摂取量は、68 kcal/100 mL のミルク A およびミルク B を哺乳していた児が 70 kcal/100 mL のミルク C を哺乳していた乳児より低かった (16.5、16.5、17.5 kcal/kg 体重/回; $P < 0.05$ based on Tukey-Kramer test)。哺乳間隔は、乳児用調製乳 A 児とミルク B 児がミルク C 児より短かった (4.5、4.5、4.9 時間; $P < 0.05$ based on Tukey-Kramer test)。タンパク質摂取量は、2.2 g/100 kcal のミルク A を哺乳していた児が 2.4 g/100 kcal のミルク C を哺乳していた乳児より有意に低かった (1.9、2.1 g/kg 体重/日; $P < 0.05$ based on Tukey-Kramer test)。

乳児用調製乳 A 児の各変数の相関関係を Figure 4-3 に示す。有意な相関関係が「体重-1 回哺乳量」、「体重-1 日哺乳量」、および「体重-哺乳間隔」に認められた ($P < 0.05$ based on Pearson's correlation coefficient、 $R = 0.74、0.36、0.59$)

4-4. 考察

本研究では、エネルギーの摂取量は、乳児用調製乳のエネルギー濃度にかかわらず次の授乳までの時間の増減を介して一定に保たれていることを明らかにした²³。加えて、乳児用調製乳 A を哺乳した乳児のエネルギーやタンパク質等の栄養摂取量 (ビオチンとヨウ素以外) は、基準値との比較、および発育指標の評価により、適切であることが示された。

乳児のエネルギー摂取量は、乳児用調製乳のエネルギー濃度にかかわらず次の授乳までの時間の増減によって一定に保たれていることが示された。単位容量あたりのエネルギー量が異なる乳児用調製乳を授乳しても、1 回の授乳で乳児が摂取する乳の容量 (体重あたり) に差異はなく、一定容量を摂取していた。一方、次の授乳までの時間は単位容量あたりのエネルギー量が低い乳では短くなり、1 日あたりのエネルギー摂取量に積算すると、調製乳の単位容量あたりのエネルギー量とは無関係に一定のエネルギー摂取量 (体重あたり) を維持していた。過去のいくつかの研究では、人工栄養児は 1 回の哺乳量の自己制御がされにくい可能性が指摘されている^{109,110}。しかし、これらの研究では、1 回の哺乳量・エネルギー摂取量に着目しており、1 日のエネルギー摂取量は評価していない。本研究で得た知見に基づくと 1 回のエネルギー摂取量に応じて哺乳間隔が増減し、結果的に 1 日のエネルギー摂取量は一定の適切な量に保たれると考えられる。本研究

で得られた結果は、乳児用ミルクの各栄養素の含量は容量あたりではなくエネルギーあたりで設計する必要があることを意味している。

乳児用調製乳 A 児 のエネルギー摂取量は適切であることが示された。FAO は人工栄養児と母乳栄養児の推定エネルギー必量を別々に示している。これは、人工栄養児のエネルギー摂取量が母乳栄養時よりも高いというデータに基づくものである^{99,107}。このため、本研究では人工栄養児向けの推定エネルギー必要量を基準値として用いた。Table 4-3 に示されているように、乳児用調製乳 A 児のエネルギー摂取量は推定平均必要量と同水準であった。過去の研究では、1 ヶ月齢時の哺乳量としてより少ない 541 mL/日 が示されている¹¹¹。当文献で示された 15-29 日齢の哺乳量 758 mL/日との乖離が大きいように見えるが、調査対象児の平均日齢や体重の違い(本研究の方が高日齢で高体重)に起因すると考えられる。本研究では、エネルギー摂取量が推定エネルギー必要量に見合っていたことに加えて乳児用調製乳 A 児の発育が母乳栄養児と同等であることを確認している(Figure 3-2、Figure 3-3)。これらの結果は、乳児が適正量のエネルギーをミルク A から摂取していることを強く裏付けるものである。

タンパク質含量 2.2 g/100 kcal のミルク A を哺乳した乳児のタンパク質摂取量は、適切であることが示された。乳児において、牛乳タンパク質の利用効率は 70%であり、母乳中タンパク質の利用性と同等であることが示されている⁸⁸。本研究では、乳児用調製乳 A 児のタンパク質摂取量が母乳栄養児より高いことを確認した。さらに乳児用調製乳 A 児の発育が母乳栄養児と同等であることを確認していることから(Figure 3-2、Figure 3-3)、乳児用調製乳 A 児においてタンパク質摂取量が不足している可能性は極めて低いと考えられた。ところで、過去の研究ではタンパク質摂取量が多すぎる場合に、BMI が生後 6 ヶ月で高値となり、5 歳時の腹膜前脂肪の過剰蓄積を引き起こしたことが報告されている^{73,89}。本研究では、乳児用調製乳 A 児と母乳栄養児の BMI は、生後 7 ヶ月および生後 12 ヶ月まで差がないことが確認されたことから、乳児用調製乳 A 児においてタンパク質摂取量は過剰ではないと考えられた。これらの知見は、乳児用調製乳 A から摂取するタンパク質量が不足も過剰もない適切な量であることを示している。

さらに、人工栄養児のタンパク質摂取量は、エネルギーあたりのタンパク質摂取量に依存して増減することが示された。乳児用調製乳 A、B、および C からのタンパク質摂取量は 1.9、2.0、2.1 g/kg 体重/日であり、乳児用調製乳のタンパク質含量 2.2、2.3、2.4 g/100 kcal に応じて増減していた(Table 4-5)。このことは、人工栄養児のエネルギー摂取量が一定に保たれていることに起因しているといえる。すなわち、乳児のタンパク質等の各栄養素の摂取量は、乳児用調製乳の「エネルギーあたりの」各栄養素の濃度に依存して増減することを明らかにした。

ビオチンとヨウ素の摂取量は十分でない可能性が示唆された。日本で市販されている乳児用調製乳においてこれらの微量栄養素は牛乳原料からの持ち込みにのみ依存している。これらの栄養素を乳児用調製乳に添加することが日本の法規では認められていなかったためである。しかしながら、満期産児向けの、牛乳原料を使用した乳児用調製乳では、少ないながらも一定量のビオチンやヨウ素が含まれているため、摂取量が極端に少ない乳児はいなかったと考えられる。ビオチンについては、現在は乳児用調製乳への添加が認められているため、今後、摂取状況は改善する見込みである。

本研究にはいくつかの限界がある。1点目は、観察研究であるため、常に未知の交絡因子の影響を受けている可能性があり、それらを考慮できないということである。2点目は自記式調査票を用いてデータを得ていることである。3点目はフォローアップの脱落やデータ欠損による選択バイアスがあることである。これらの手法上の限界は、結果の過大評価や過小評価の要因となり得る。最後に、タンパク質や微量栄養素の摂取量の過剰・不足の評価は、本来的には臨床上の所見や血中濃度に基づく総合的判断によってなされる必要がある。しかしながら、健常乳児を対象とした介入的試験は、倫理面を考慮すると実施が困難である。さらに、市販の乳児用調製乳からの栄養摂取量等を評価した研究はほとんどない。したがって、本研究で得られた結果は、極めて貴重なものであるといえる。

本研究では、乳児のエネルギー摂取量は哺乳間隔の増減を介して一定に保たれることを明らかにした。加えて、ミルクAを哺乳した乳児の栄養摂取量(ビオチンとヨウ素以外)が適切であることを、基準値との比較および乳児の発育により確認した。これらのことは、「乳児には欲しがるだけ母乳やミルクを与えることで自ずとエネルギー摂取量が適切に保たれる」こと、および「市販の乳児用調製乳Aの栄養設計が適切であること」を示唆している。本研究で得られた知見は、将来の乳児栄養の改善に欠かせない根拠となるだろう。

图表

Table 4-1. Protein, Fat, and Carbohydrate composition of Formulas A, B, and C²³.

	Formula A	Formula B ⁹⁷	Formula C ¹⁰⁶	Breast milk ^{a-c}
	per 100 kcal			
Protein^d, g	2.2	2.3	2.4	1.47–2.33
Fat, g	5.16	5.13	5.00	4.2–6.6
Arachidonic acid ^d , mg	0.013	0.0051		0.013–0.024
Docosahexaenoic acid ^d , mg	0.02	0.02		0.019–0.066
Carbohydrate, g	11.4	11.4	11.6	8.9–13.9
Fructo-oligosaccharides, g	0.4	0.4	0.4	N/A
Amino acid				
Isoleucine, mg	124	126	ND	66–114
Leucine, mg	216	216	ND	128–224
Lysine, mg	182	175	ND	86–150
Methionine + Cystine, mg	88	82	ND	49–87
Phenylalanine + Tyrosine, mg	173	160	ND	95–173
Threonine, mg	131	130	ND	57–103
Tryptophan, mg	37	40	ND	21–43
Valine, mg	137	135	ND	72–124
Histidine, mg	60	62	ND	36–70
Arginine, mg	60	66	ND	43–79

^a Japanese breast milk composition based on Yamawaki N (2005)¹⁷

^b Range from the mean minus standard deviation to the mean plus standard deviation

^c Mean and standard deviation of docosahexaenoic acid in breastmilk were geometrically calculated.

^d For commercially available infant formulas other than Formula A in Japan, the concentrations of protein, arachidonic acid, and docosahexaenoic acid are 2.15–2.38, 0–0.008 and 0–0.014 g/100 kcal, respectively.

Table 4-2. Vitamins and minerals composition of Formulas A, B, and C²³.

	Formula A	Formula B	Formula C
Vitamins			
Vitamin A, μ g	77	77	102
Vitamin D, μ g	1.3	1.3	1.9
Vitamin E, μ g	1.2	1.2	1.2
Vitamin K, μ g	4.9	5	5
Vitamin B ₁ , mg	0.079	0.06	0.06
Vitamin B ₂ , mg	0.12	0.12	0.12
Niacin, mg	0.59 [†]	1.2 [‡]	1.2 [‡]
Vitamin B ₆ , mg	0.059	0.06	0.06
Vitamin B ₁₂ , μ g	0.4	0.4	0.4
Vitamin C, mg	14	9.9	9
Folic acid, μ g	20	20	20
Pantothenic acid, mg	0.85	0.73	0.4
Biotin, μ g	0.5	0.5	ND
Minerals			
Sodium, mg	28	28	28
Potassium, mg	97	97	98
Calcium, mg	75	75	76
Magnesium, mg	7.9	7.9	8
Phosphorus, mg	42	42	42
Chloride, mg	61	61	62
Iron, mg	1.2	1.2	1.2
Zinc, mg	0.59	0.59	0.56
Copper, mg	0.063	0.063	0.064
Manganese, μ g	7.9	5.9	20
Iodine, μ g	0.01	0.01	ND
Selenium, μ g	2.1	1.5	ND

† Preformed niacin only

‡ Niacin equivalent

ND: no data.

Table 4-3. Characteristics and daily intake of formula A-fed infants²³.

Days of age		15-29	30-59	90-119	120-149
N		29	149	68	132
Infants					
Age	days	29 (3)	34 (3)	109 (12)	129 (10)
Body weight	kg	4.1 (0.5)	4.3 (0.5)	6.4 (0.9)	7.0 (0.7)
Daily intake					
Volume	mL/day	758 (158)	813 (151)	862 (151)	887 (137)
Protein	g/day	11.4 (2.4)	12.2 (2.3)	13.0 (2.3)	13.3 (2.1)
Energy	kcal/kg/day	128 (29)	129 (23)	92 (17)	86 (14)
EER ^a	kcal/kg/day	120		86	

Values are expressed as the mean (standard deviation).

^a Estimated energy requirements set by the Food and Agriculture Organization of the United Nations, for formula-fed infants aged 1 and 5 months of body weight 4.5 and 7.2 kg, respectively.

Table 4-4. Daily intake of protein, vitamins, and minerals of Formula A-fed infants²³.

		Age		120-149 days of age		RNI ^{a)}
		15-29 days of age				
Vitamin A	μ gRE	399	(83)	466	(72)	375
Vitamin D	μ g	6.7	(1.4)	7.8	(1.2)	5
Vitamin E	mg	6.2	(1.3)	7.3	(1.1)	2.7
Vitamin K	μ g	25	(5)	30	(5)	5
Vitamin B ₁	mg	0.41	(0.09)	0.48	(0.07)	0.2
Vitamin B ₂	mg	0.61	(0.13)	0.71	(0.11)	0.3
Niacin	mg	3.1	(0.6)	3.6	(0.6)	2
Vitamin B ₆	mg	0.31	(0.06)	0.36	(0.06)	0.1
Vitamin B ₁₂	μ g	2.1	(0.4)	2.4	(0.4)	0.4
Folic acid	μ g	104	(22)	121	(19)	80
Pantothenic acid	mg	4.4	(0.9)	5.1	(0.8)	1.7
Biotin	μ g	2.6	(0.5)	3.0	(0.5)	5
Vitamin C	mg	72	(15)	84	(13)	25
Calcium	mg	388	(81)	454	(70)	300
Magnesium	mg	41	(9)	48	(7)	26
Zinc	mg	3.1	(0.6)	3.6	(0.6)	2.8
Iodine	μ g	51	(11)	60	(9)	90
Selenium	μ g	11	(2)	12	(2)	6

Values are expressed as the mean (standard deviation).

a) Recommended nutrient intakes set by the FAO and WHO¹⁰⁸

Table 4–5. Feeding pattern in infants fed Formulas A, B, and C at 90–149 days of age²³.

		Formula A	Formula B ^d	Formula C ^e	<i>P</i> value
Energy	kcal/100 mL	68	68	70	
Protein	g/100 kcal	2.2	2.3	2.4	
	N	200	235	497	–
Daily energy intake	kcal/kg/day	88 (15)	88 (26)	88 (17)	NS
Volume per feeding	mL/kg/feeding	24.3 (4.7)	24.3 (6.9)	25.0 (7.3)	NS
Energy per feeding	kcal/kg/feeding	16.5 ^a (3.2)	16.5 ^a (4.7)	17.5 ^b (5.1)	<0.05
Feeding interval	h	4.5 ^a (0.7)	4.6 ^a (0.8)	4.9 ^b (1.2)	<0.05
Daily protein intake	g/kg/day	1.9 ^a (0.3)	2.0 ^{a,b} (0.6)	2.1 ^b (0.4)	<0.05

Values are expressed as the mean (standard deviation).

Values with different letters (^a, ^b, and ^c) within columns indicate significant difference based on Tukey–Kramer test

^d Data of Formula B–fed infants aged 90–149 days from a previous study¹⁰⁵

^e Data of Formula C–fed infants aged 90–149 days from a previous study¹⁰⁶

NS: not significant.

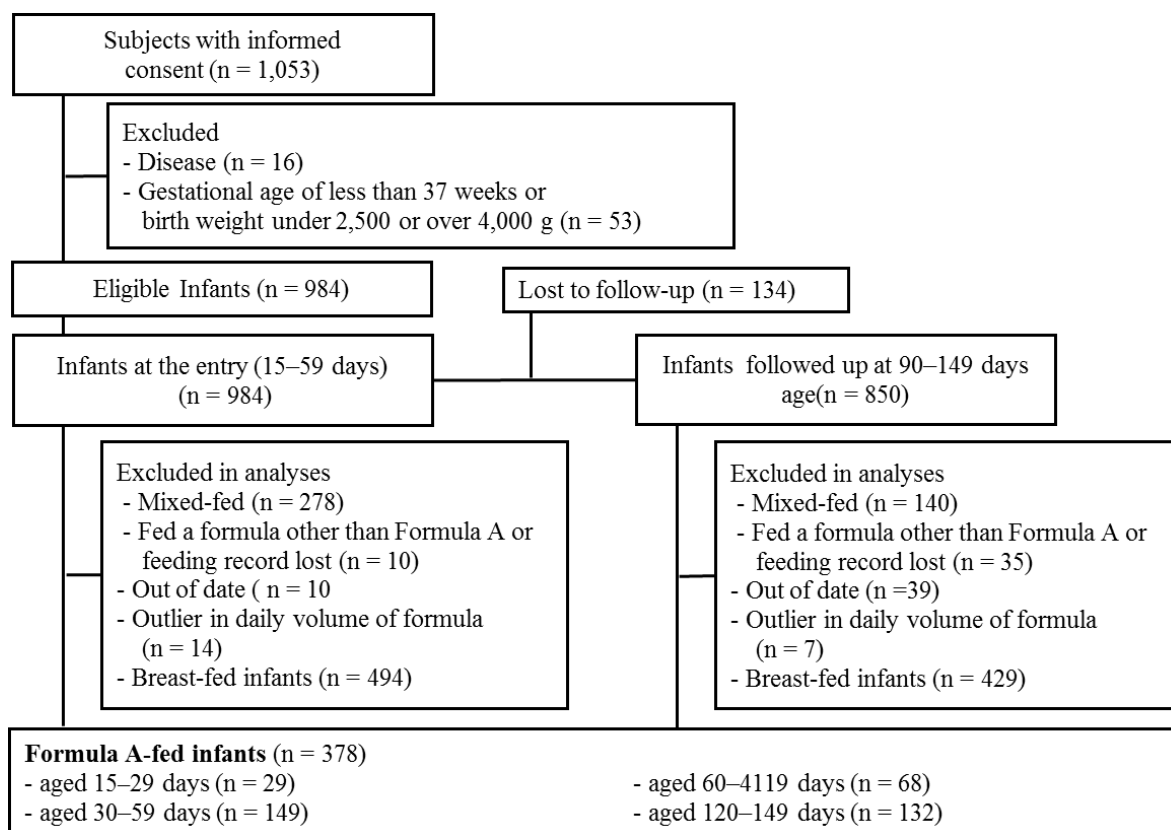


Figure 4–1. Flowchart of the study design²³.

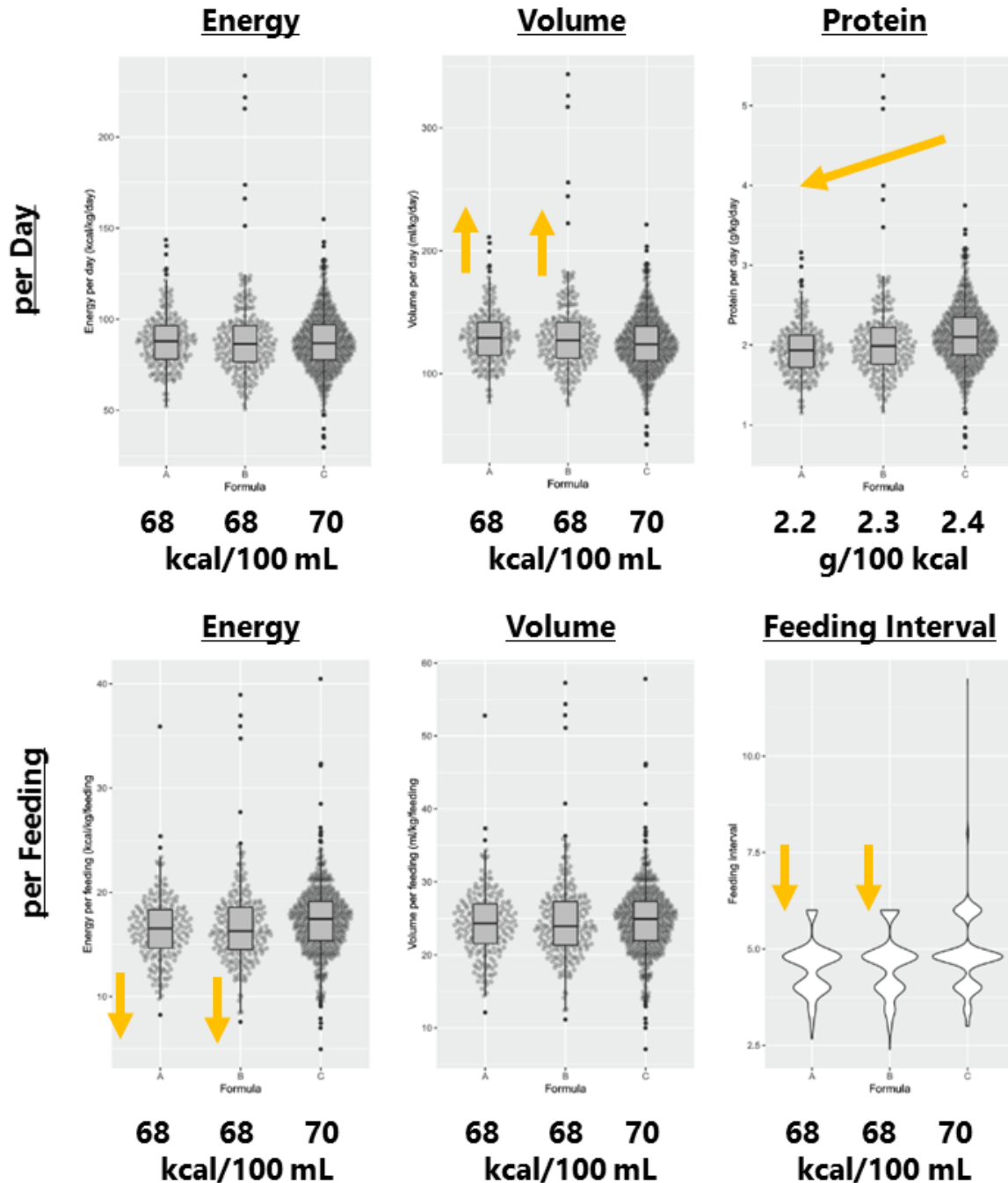


Figure 4–2. Feeding pattern in infants fed Formulas A, B, and C at 90–149 days of age. Formula A: 68 kcal/100 mL, 2.2 g protein/100 kcal. Formula B: 68 kcal/100 mL, 2.3 g protein/100 kcal. Formula C: 70 kcal/100 mL, 2.4 g protein/100 kcal. Table 3–5 includes the data in Figure 3–2.

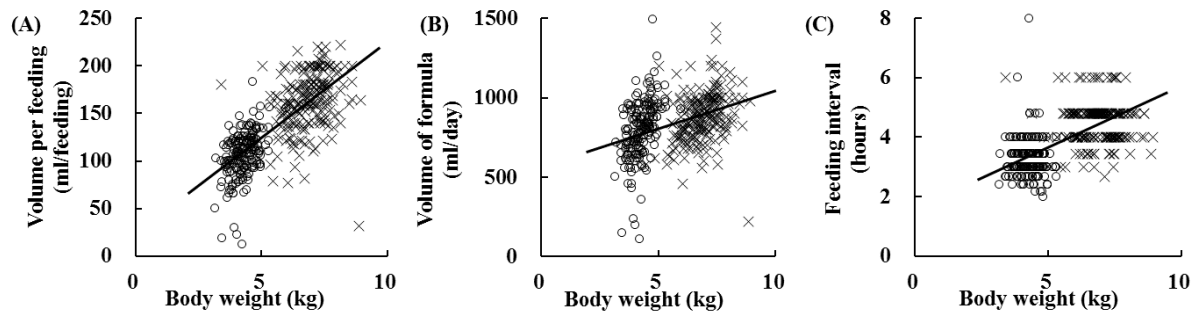


Figure 4-3. Relationship between body weight and each feeding variable in Formula A-fed infants²³. Relationships between (A) body weight and volume per feeding, (B) body weight and volume of formula, and (C) body weight and feeding interval (○: at 15–59 days of age, ×: at 90–149 days of age). For all infants aged 15–149 days, significant correlations were observed in (A), (B), and (C) based on Pearson's correlation coefficient ($P < 0.05$, $R = 0.74$, 0.36 , and 0.59 , respectively).

総合考察

本研究では、Prebiotics 摂取を介して周産期の腸内細菌叢を健全にして腸管免疫を賦活することにより、母乳 sIgA および腸内細菌の母子伝播を修飾し得ることを明らかにした。また、タンパク質含量を低減した乳児用調製乳の栄養組成が適切であることを乳児の発育評価により明らかにした。乳児の哺乳行動に着目した研究では、乳児が 1 回の授乳で摂取する容量は一定で、乳用調製乳のエネルギー濃度に依存して 1 回に摂取するエネルギー量は増減するが、摂取したエネルギー量に応じて次の授乳までの間隔が調節されており、結果として乳児の 1 日のエネルギー摂取量は一定に保たれていることを明らかにした(Figure S4)。

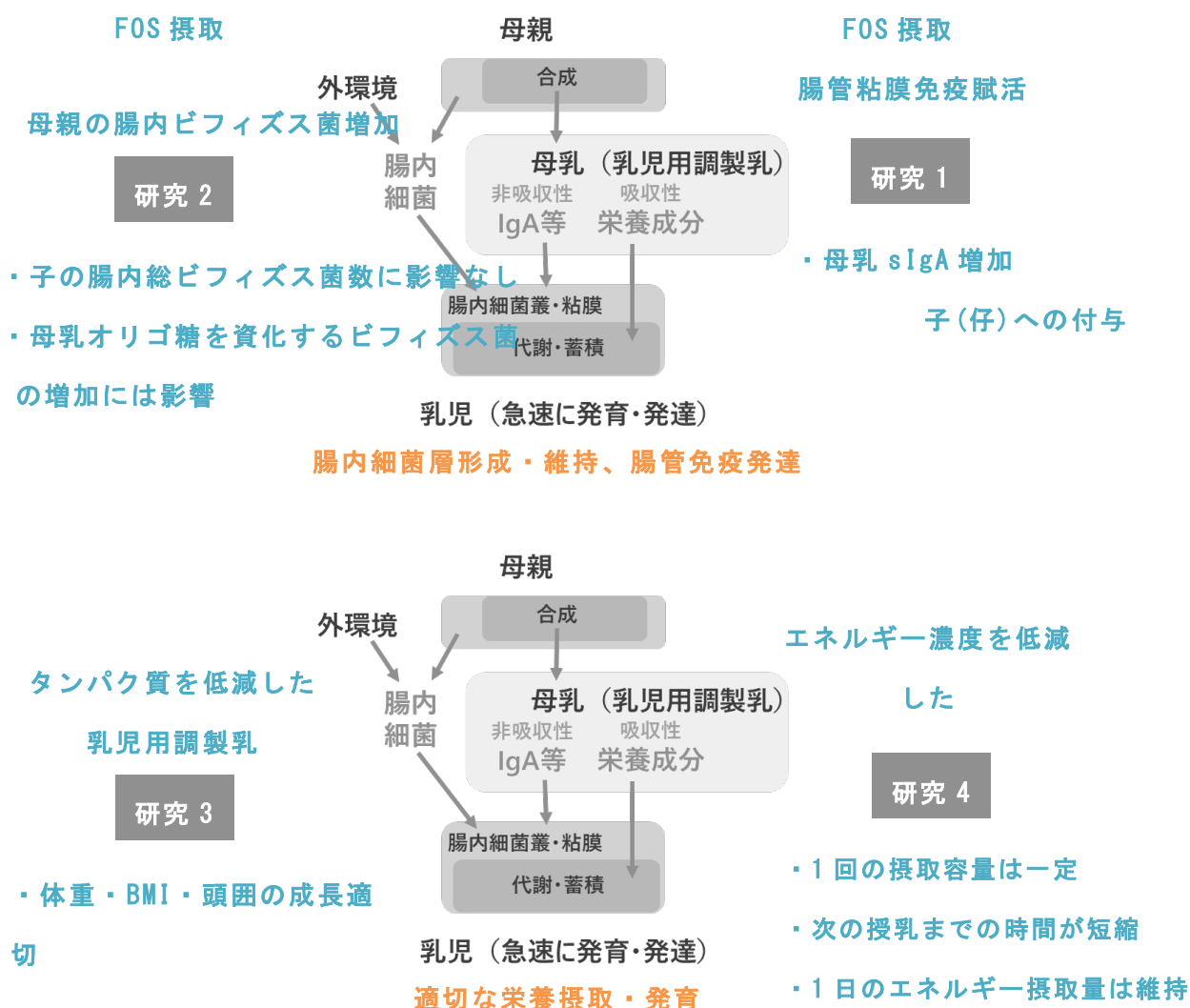


Figure S4. 研究 1~4 の概要

Prebiotics は有用な効果を比較的安全に得られる食品であるが、今後は種類選定が重要な観点になるだろう。FOS は、これまでに様々な生理効果が確認されている Prebiotics であり、米国 FDA に GRAS (Generally Recognized as Safe) として登録されている。本研究では、妊婦で下痢・腹痛などの副作用を伴わずに腸内ビフィズス菌数や排便回数を増やすことを確認するとともに、マウスでは腸管および母乳中の総 sIgA レベルを高めることを明らかにした。Prebiotics と類似した作用を有するプロバイオティクスについては、プロバイオティクス菌のバクテリアルトランスロケーションによる感染症発症事例が報告されている¹¹²。ハイリスク対象者である妊婦や乳児にとっては、より安全な Prebiotics を選択する意義は大きいといえる。一方で、Prebiotics は特定の腸内細菌を優先的に増やすことを介して様々な作用を発揮することから、宿主の腸内細菌叢の違いが Prebiotics 摂取の作用の違いを生む可能性が十分に考えられる。腸内細菌叢には個人間差、個人内差がある。本研究で得られた知見は、個々のライフステージ、環境、腸内細菌叢に適した Prebiotics を選定することで作用をより効果的に得られることを示唆するものである。

本研究で実施した乳児の観察研究では、研究デザインの工夫により新たな観点での有用な知見を見出せることを示した。乳児の発育は、母乳や乳児用調製乳の栄養組成、哺乳行動、周産期の母親の栄養状態、離乳食および食事からの栄養摂取量によっても影響される。さらに、これらの栄養要因が将来にたる発育や健康状態をも左右しうることが明らかになりつつある。乳児を対象とした観察研究では、上記のような影響因子を考慮して研究を設計することで、乳児の哺乳行動に関わる貴重な情報を得られることが示された。乳児を対象とした介入試験は、安全上、倫理上の観点で実施の障壁が高いことから、本研究のような「乳児の観察研究」を積み重ねることの意義は極めて大きいと考えられる。

本研究では、sIgA と腸内細菌の母子伝播および乳児の栄養摂取、発育に着目し、一連の研究を実施した。母乳は、豊富な IgA を介して乳児の体外である腸内環境の形成に寄与するとともに、ビタミン K やビタミン D 等の一部の例外はあるものの有乳児に必要なほぼすべての栄養を供給している。こうした観点から、母乳は乳児にとって極めて有用な食品であるといえる。一方で、乳児の母親にウイルス感染や投薬がある場合や乳児に先天性代謝異常や食物アレルギーがある場合等、やむを得ず母乳栄養が中断されることがある。このような場合は人工栄養を選択することとなり、乳児用調製乳が唯一の食物となる。女性の社会進出が拡大していることから、母乳栄養、人工栄養にかかわらず安心して育児ができる社会が望まれている。本研究で得られた知見が、母乳栄養、人工栄養の両面から乳児の適切な発育、発達を支えるための科学的根拠の一つとなることを期待する。

謝辞

本学位論文における研究は、株式会社 明治 および千葉大学で行われたものです。ヒトでの Prebiotics 摂取の介入研究を実施していただいた千葉大学 下条直樹教授に心から感謝申し上げます。また、この介入研究および乳児発育調査研究に参加いただいた母子およびそのご家族に感謝申し上げます。

名古屋大学大学院生命農学研究科 松田幹教授は、学生時代の私に「研究は、様々な方と関わることで面白く、有用なものになっていく」ことを気付かせてくださいました。本学位論文の作成・推敲にあたっては、高い視点から考察することやそれを分かりやすく表現することの重要性を気付かせてくださいました。深く感謝申し上げます。

本学位論文にまとめた一連の研究を実施するにあたり、日頃より大変お世話になった株式会社 明治の 金子哲夫博士、高橋毅博士、長田昌士博士、木ノ内俊博士、中村吉孝博士、菅野貴浩さん、山崎香枝さん、および乳児発育調査において全国の病産院で研究参加同意を取得して下さった株式会社 明治の栄養士の皆様に深く感謝いたします。

最後に、基礎を築いた名古屋大学農学部への進学を温かく見守ってくださった両親、子育てで大変な時期にもかかわらず本学位論文への取り組みを快く応援してくれた妻、いつも笑顔で私を元気づけてくれた長男、長女に謝意を表して謝辞といたします。

以上

引用文献

1. MacPherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* **1**, 11–22 (2008).
2. Cerutti, A., Puga, I. & Cols, M. Innate control of B cell responses. *Trends Immunol.* **32**, 202–11 (2011).
3. Fagarasan, S. *et al.* Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science (80-.)*. **298**, 1424–1427 (2002).
4. Rol, N., Favre, L., Benyacoub, J. & Corthésy, B. The role of secretory immunoglobulin a in the natural sensing of commensal bacteria by mouse Peyer' s patch dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 40074–40082 (2012).
5. Tanneau, G. M., Hibrand-Saint Oyant, L., Chevaleyre, C. C. & Salmon, H. P. Differential recruitment of T- and IgA B-lymphocytes in the developing mammary gland in relation to homing receptors and vascular addressins. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1581–92 (1999).
6. Salmon, H. Immunophysiology of the mammary gland and transmission of immunity to the young. *Reprod. Nutr. Dev.* **43**, 471–5 (2003).
7. Nakamura, Y. *et al.* Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. *Clin. Exp. Immunol.* **137**, 52–58 (2004).
8. Yoshida, N. *et al.* Effects of 1-Kestose and Nystose on the Intestinal Microorganisms and Immune System in Mice. *J. Appl. Glycosci.* (2006). doi:10.5458/jag.53.175
9. Jinno, S., Nakamura, Y., Nagata, M. & Takahashi, T. 1-Kestose consumption during pregnancy and lactation increases the levels of IgA in the milk of lactating mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 861–6 (2014).
10. Mitsuoka, T. Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci. microbiota, food Heal.* **33**, 99–116 (2014).
11. Cummings, J. H. *et al.* PASSCLAIM--gut health and immunity. *Eur. J. Nutr.* **43 Suppl 2**, II118–II173 (2004).
12. Grönlund, M. M., Arvilommi, H., Kero, P., Lehtonen, O. P. & Isolauri, E. Importance of intestinal

- colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **83**, F186–F192 (2000).
13. Gomez de Agüero, M. *et al.* The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* **351**, 1296–302 (2016).
 14. Ruiz, L., Moles, L., Gueimonde, M. & Rodriguez, J. M. *Perinatal microbiomes influence on preterm birth and preterms' health: influencing factors and modulation strategies.* *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* (2016). doi:10.1097/MPG.0000000000001196
 15. Jinno, S. *et al.* Maternal prebiotic ingestion increased the number of fecal bifidobacteria in pregnant women but not in their neonates aged one month. *Nutrients* **9**, (2017).
 16. Koletzko, B. *et al.* Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age 2 y: a randomized clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 1836–1845 (2009).
 17. Yamawaki, N. *et al.* Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19**, 171–81 (2005).
 18. Jinno, S., Yamazaki, K., Nakamura, Y. & Kinouchi, T. Growth of term infants fed a commercial infant formula with a protein content of 2.2 g/100 kcal: an observational follow-up study. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 633–639 (2020).
 19. Weber, M. *et al.* Lower protein content in infant formula reduces BMI and obesity risk at school age: Follow-up of a randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **99**, 1041–1051 (2014).
 20. Birch, E. E., Garfield, S., Hoffman, D. R., Uauy, R. & Birch, D. G. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev. Med. Child Neurol.* **42**, 174–81 (2000).
 21. Birch, E. E. *et al.* Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. *Early Hum. Dev.* **83**, 279–284 (2007).
 22. Jinno, S. Infant Growth Evaluation: Essential for Appropriate Design of Infant Formula. *Milk Sci.* **64**, 35–42 (2015).
 23. Jinno, S., Yamazaki, K., Nakamura, Y. & Kinouchi, T. Daily protein and energy intakes of infants fed a commercial infant formula with a reduced protein concentration of 2.2 g/100 kcal: an impact of feeding interval on energy intake. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2020).

doi:10.1080/09168451.2020.1722609

24. Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. & Tashiro, Y. Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobact. Microflora* **5**, 37–50 (1986).
25. Mitsuoka, T., Hidaka, H. & Eida, T. Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung* **31**, 427–436 (1987).
26. Bouhnik, Y. *et al.* Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutr. Cancer* **26**, 21–29 (1996).
27. Bouhnik, Y. *et al.* Short-Chain Fructo-Oligosaccharide Administration Dose-Dependently Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Humans. *J. Nutr.* **129**, 113–117 (1999).
28. Tominaga, S., Hirayama, M., Adachi, T., Tokunaga, T. & Iino, H. Effects of Ingested Fructooligosaccharides on Stool Frequency in Healthy Female Volunteers: A Placebo-Controlled Study. *Biosci. microflora* **18**, 49–53 (1999).
29. Fukasawa, T. *et al.* Identification of marker genes for lipid-lowering effect of a short-chain fructooligosaccharide by DNA microarray analysis. *J. Diet. Suppl.* **6**, 254–262 (2009).
30. Oku, T., Tokunaga, T. & Hosoya, N. Nondigestibility of a new sweetener, ‘Neosugar,’ in the rat. *J. Nutr.* **114**, 1574–1581 (1984).
31. Ohta, A. *et al.* Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *J. Nutr.* **125**, 2417–24 (1995).
32. Cherbut, C., Michel, C. & Lecannu, G. The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J. Nutr.* **133**, 21–27 (2003).
33. Hosono, A. *et al.* Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer’s patch cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 758–764 (2003).
34. Ito, H. *et al.* Degree of polymerization of inulin-type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin a secretion in the rat cecum. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5771–5778 (2011).
35. Yanagibashi, T. *et al.* Bacteroides induce higher iga production than lactobacillus by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in b cells in murine peyer’s patches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 372–377 (2009).
36. Halsey, J. F., Mitchell, C., Meyer, R. & Cebra, J. J. Metabolism of immunoglobulin A in lactating

- mice: origins of immunoglobulin A in milk. *Eur. J. Immunol.* **12**, 107–112 (1982).
37. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J. & Takada, T. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7220–7228 (2004).
 38. Dubernet, S., Desmasures, N. & Guéguen, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**, 271–275 (2002).
 39. Yasui, H. *et al.* Detection of Bifidobacterium Strains that Induce Large Quantities of IgA. *Microb. Ecol. Health Dis.* **5**, 155–162 (1992).
 40. Tannock, G. W., Fuller, R., Smith, S. L. & Hall, M. A. Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1225–1228 (1990).
 41. Mikami, K. *et al.* Influence of maternal bifidobacteria on the establishment of bifidobacteria colonizing the gut in infants. *Pediatr. Res.* **65**, 669–674 (2009).
 42. Arboleya, S. *et al.* Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**, 763–772 (2012).
 43. Jakobsson, H. E. *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. 559–566 (2014). doi:10.1136/gutjnl-2012-303249
 44. Arboleya, S. *et al.* Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J. Pediatr.* **166**, 538–544 (2015).
 45. Gomez-Llorente, C. *et al.* Three main factors define changes in fecal microbiota associated with feeding modality in infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **57**, 461–6 (2013).
 46. Shadid, R. *et al.* Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity—a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 1426–37 (2007).
 47. Review. Bornet, F. R. J. & Brouns, F. Immune-stimulating and gut health-promoting properties of short-chain fructo-oligosaccharides. *Nutr. Rev.* **60**, 326–34 (2002).
 48. Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Paineau, D. & Bornet, F. The capacity of short-chain

- fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr. J.* **5**, 8 (2006).
49. Tahiri, M. *et al.* Five-Week Intake of Short-Chain Fructo-Oligosaccharides Increases Intestinal Absorption and Status of Magnesium in Postmenopausal Women. **16**, 2152-2160 (2001).
 50. Waitzberg, D. L. *et al.* Effect of synbiotic in constipated adult women e A randomized , double-blind , placebo-controlled study of clinical response q. *Clin. Nutr.* **32**, 27-33 (2013).
 51. Tousen, Y., Uehara, M., Abe, F., Kimira, Y. & Ishimi, Y. Effects of short-term fructooligosaccharide intake on equol production in Japanese postmenopausal women consuming soy isoflavone supplements: a pilot study. *Nutr. J.* **12**, 127 (2013).
 52. Ducros, V. *et al.* Influence of short-chain fructo-oligosaccharides (sc-FOS) on absorption of Cu, Zn, and Se in healthy postmenopausal women. *J. Am. Coll. Nutr.* **24**, 30-37 (2005).
 53. Tahiri, M. *et al.* Effect of short-chain fructooligosaccharides on intestinal calcium absorption and calcium status in postmenopausal women: A stable-isotope study. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 449-457 (2003).
 54. Tani, M. Effect of Fructooligosaccharides on conspitaion in pregnant and lying-in women. *Matern. Heal.* **31**, 352-357 (1990).
 55. Matsuki, T. *et al.* Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5445-5451 (2002).
 56. Matsuki, T. *et al.* A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nat. Commun.* **7**, 11939 (2016).
 57. Kubota, T. *et al.* Prebiotic consumption in pregnant and lactating women increases IL-27 expression in human milk. *Br. J. Nutr.* **18**, 1-8 (2013).
 58. Matsuki, T. *et al.* Quantitative PCR with 16S Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 167-173 (2004).
 59. Lewis, S. J. & Heaton, K. W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**, 920-924 (1997).
 60. Grönlund, M. M. *et al.* Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J. Pediatr.*

- Gastroenterol. Nutr.* **28**, 19–25 (1999).
61. Bennet, R., Nord, C. E. & R bennet. development of the faecal anaerobic microflora. *Infection* **15**, 332–336 (1987).
 62. Grönlund, M. *et al.* Maternal breast–milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy* **37**, 1764–1772 (2007).
 63. Maldonado–Gomez, M. X. *et al.* Stable Engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the human Gut Depends on Individualized Features of the Resident Microbiome. (2016).
 64. Rungsiprakarn, P., Laopaiboon, M., Sangkomkarn, U. S., Lumbiganon, P. & Pratt, J. J. Interventions for treating constipation in pregnancy. *The Cochrane database of systematic reviews* **9**, CD011448 (2015).
 65. Dimidi, E., Christodoulides, S., Fragkos, K. C., Scott, S. M. & Whelan, K. The effect of probiotics on functional constipation in adults: a systematic review and meta–analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **100**, 1075–84 (2014).
 66. European Commission. Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formulae and Follow–on Formulae. 1–211 (2003).
 67. Codex Alimentarius CODEX STAN 72 – 1981. STANDARD FOR INFANT FORMULA AND FORMULAS FOR SPECIAL MEDICALPURPOSES INTENDED FOR INFANTS Sections A&B Revision 2007. Amended 2011. *Codex Aliment. Comm.* (2011).
 68. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies, N. Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow–on formulae. *EFSA J.* **12**, 3760 (2014).
 69. Fomon, S. J., Ziegler, E. E., Nelson, S. E. & Frantz, J. A. What is the safe protein–energy ratio for infant formulas? *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 358–363 (1995).
 70. Fomon, S. J., Ziegler, E. E., Nelson, S. E., Rogers, R. R. & Frantz, J. A. Infant formula with protein–energy ratio of 1.7 g/100 kcal is adequate but may not be safe. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**, 495–501 (1999).
 71. Riih , N. C. R. *et al.* Whey predominant, whey modified infant formula with protein/energy ratio of 1.8 g/100 kcal: adequate and safe for term infants from birth to four months. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **35**, 275–81 (2002).
 72. Turck, D. *et al.* Adequacy and Safety of an Infant Formula With a Protein/Energy Ratio of 1.8

- g/100 kcal and Enhanced Protein Efficiency for Term Infants During the First 4 Months of Life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **43**, 364–371 (2006).
73. Koletzko, B. *et al.* Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **89**, 1836–1845 (2009).
 74. Koletzko, B. *et al.* Can infant feeding choices modulate later obesity risk? **89**, 1502–1509 (2009).
 75. Hadley, K., Ryan, A., Forsyth, S., Gautier, S. & Salem, N. The Essentiality of Arachidonic Acid in Infant Development. *Nutrients* **8**, 216 (2016).
 76. Martinez, M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J. Pediatr.* **120**, S129–38 (1992).
 77. Salem, N., Wegher, B., Mena, P. & Uauy, R. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 49–54 (1996).
 78. Cheong, J. L. Y. *et al.* Head growth in preterm infants: correlation with magnetic resonance imaging and neurodevelopmental outcome. *Pediatrics* **121**, e1534–e1540 (2008).
 79. Gale, C. R., O’Callaghan, F. J., Bredow, M., Martyn, C. N. & Avon Longitudinal Study of Parents and Children Study Team. The Influence of Head Growth in Fetal Life, Infancy, and Childhood on Intelligence at the Ages of 4 and 8 Years. *Pediatrics* **118**, 1486–1492 (2006).
 80. Cooke, R. W., Lucas, A., Yudkin, P. L. & Pryse-Davies, J. Head circumference as an index of brain weight in the fetus and newborn. *Early Hum. Dev.* **1**, 145–9 (1977).
 81. Xiang, M., Alfvén, G., Blennow, M., Trygg, M. & Zetterström, R. Long-chain polyunsaturated fatty acids in human milk and brain growth during early infancy. *Acta Paediatr.* **89**, 142–7 (2000).
 82. Jinno, S., Nakamura, Y., Kanno, T., Kaneko, T. & Kinouchi, T. 原著論文 人工栄養児のエネルギーおよび各栄養素の摂取量. **63**, (2014).
 83. Bekkali, N., Hamers, S. L., Reitsma, J. B., Van Toledo, L. & Benninga, M. A. Infant Stool Form Scale: Development and Results. *J. Pediatr.* **154**, 521–526.e1 (2009).
 84. Rozé, J. C. *et al.* An α -lactalbumin-enriched and symbiotic-supplemented v. a standard infant formula: A multicentre, double-blind, randomised trial. *Br. J. Nutr.* (2012).

doi:10.1017/S000711451100479X

85. Gibson, R. A. *et al.* Safety of supplementing infant formula with long-chain polyunsaturated fatty acids and *Bifidobacterium lactis* in term infants: A randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* (2009). doi:10.1017/S0007114508084080
86. Fleddermann, M. *et al.* Infant formula composition affects energetic efficiency for growth: The BeMIM study, a randomized controlled trial. *Clin. Nutr.* **33**, 588–595 (2014).
87. American Academy of Pediatrics. Clinical testing of infant formulas with respect to nutritional suitability for term infants. Report to the FDA. (1988). Available at: <https://wayback.archive-it.org/7993/20170722090324/https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/InfantFormula/ucm170649.htm>.
88. WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 1–265 (2007). doi:ISBN 92 4 120935 6
89. J., B. *et al.* Association of early protein intake and pre-peritoneal fat at five years of age: Follow-up of a randomized clinical trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* (2016).
90. Kinouchi, T., Koyama, S., Harada, E. & Yajima, T. Large molecule protein feeding during the suckling period is required for the development of pancreatic digestive functions in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **303**, R1268–76 (2012).
91. Hoffman, D. R. *et al.* Impact of early dietary intake and blood lipid composition of long-chain polyunsaturated fatty acids on later visual development. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **31**, 540–53 (2000).
92. Sabirov, A., Casey, J. R., Murphy, T. F. & Pichichero, M. E. Breast-feeding is associated with a reduced frequency of acute otitis media and high serum antibody levels against NTHi and outer membrane protein vaccine antigen candidate P6. *Pediatr. Res.* **66**, 565–70 (2009).
93. Lieberthal, A. S. *et al.* *The Diagnosis and Management of Acute Otitis Media. Pediatrics* **131**, (2013).
94. Taylor, S. *et al.* Impact of pneumococcal conjugate vaccination on otitis media: A systematic review. *Clinical Infectious Diseases* **54**, 1765–1773 (2012).
95. Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy. Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy. (2016). Available at: http://www.jspaci.jp/allergy_2016/index.html.
96. Greer, F. R., Sicherer, S. H., Burks, A. W., COMMITTEE ON NUTRITION & SECTION ON ALLERGY AND IMMUNOLOGY. The Effects of Early Nutritional Interventions on the

- Development of Atopic Disease in Infants and Children: The Role of Maternal Dietary Restriction, Breastfeeding, Hydrolyzed Formulas, and Timing of Introduction of Allergenic Complementary Foods. *Pediatrics* **143**, e20190281 (2019).
97. Jinno, S., Nakamura, Y., Kanno, T., Kaneko, T. & Kinouchi, T. Intake of energy and nutrients in exclusively formula-fed infants. *Milk Sci.* **63**, 63–69 (2014).
 98. Dewey, K. G. & Lönnnerdal, B. Infant self-regulation of breast milk intake. *Acta Paediatr. Scand.* **75**, 893–8 (1986).
 99. Butte, N. F. *et al.* Energy expenditure and deposition of breast-fed and formula-fed infants during early infancy. *Pediatr. Res.* **28**, 631–40 (1990).
 100. Heinig, M. J., Nommsen, L. A., Peerson, J. M., Lonnerdal, B. & Dewey, K. G. Energy and protein intakes of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life and their association with growth velocity: the DARLING Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 152–161 (1993).
 101. Baird, J. *et al.* Milk feeding and dietary patterns predict weight and fat gains in infancy. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **22**, 575–86 (2008).
 102. Dewey, K. G. Growth Characteristics of Breast-Fed Compared to Formula-Fed Infants. *Neonatology* **74**, 94–105 (1998).
 103. Kramer, M. S. *et al.* Feeding effects on growth during infancy. *J. Pediatr.* **145**, 600–605 (2004).
 104. Fomon, S. J., Filmer, L. J., Thomas, L. N., Anderson, T. A. & Nelson, S. E. Influence of formula concentration on caloric intake and growth of normal infants. *Acta Paediatr. Scand.* **64**, 172–81 (1975).
 105. Kanno, T., Jinno, S. & Kaneko, T. Survey of the Anthropometric Growth, Nutritional Intake, Fecal Properties, and Morbidity of Infants, in Relation with Feeding Methods (XI). *J. Child Heal.* **72**, 253–260 (2013).
 106. Yonekubo, A. & Kanno, T. A Survey of Physical Growth, Nutritional Intake, Fecal Properties and Morbidity of Infants as Related to Feeding Methods (VIII). *J. Child Heal.* **58**, 93–103 (1999).
 107. Food and Agricultural Organization. Human energy requirements: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *FAO Food Nutr. Tech. Rep. Ser.* **0**, 96 (2001).
 108. FAO & WHO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second edition. *World Heal. Organ. Food Agric. Organ. United Nations* (2004). doi:92 4 154612 3

109. Li, R., Fein, S. B. & Grummer-Strawn, L. M. Do Infants Fed From Bottles Lack Self-regulation of Milk Intake Compared With Directly Breastfed Infants? *Pediatrics* **125**, e1386–e1393 (2010).
110. Ventura, A. K., Beauchamp, G. K. & Mennella, J. A. Infant regulation of intake: The effect of free glutamate content in infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 875–881 (2012).
111. Isomura, H. *et al.* Type of milk feeding affects hematological parameters and serum lipid profile in Japanese infants. *Pediatr. Int.* **53**, 807–813 (2011).
112. Mahlen, S. D. & Clarridge, J. E. Site and clinical significance of *Alloscardovia omnicolens* and *Bifidobacterium* species isolated in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* (2009).
doi:10.1128/JCM.00555–09