

## &lt; 研究課題 &gt;

## 長期経管栄養が腸内細菌叢を介して加齢変化に及ぼす影響に関する研究

代表研究者	大阪大学大学院連合小児発達学研究科	教授	木村 亮
共同研究者	摂南大学農学部応用生物科学科	教授	井上 亮
共同研究者	東大寺福祉療育病院	小児神経科医	富和 清隆

## 【抄録】

本研究の目的は、長期にわたり経管栄養を受ける重症心身障害者を対象に、腸内細菌叢および加齢への影響を解明することである。我が国では、経口摂取が困難な高齢者に対して経管栄養療法が広く行われており、短期的な栄養改善には有効である一方、その長期的な影響については十分に明らかにされていない。本研究では、長期的な経管栄養が腸内細菌叢の乱れを引き起こし、加齢を促進する可能性を検証した。47 名の重症心身障害者および健常者を対象とし、16S rRNA シーケンスおよび短鎖脂肪酸解析を実施した。その結果、重症心身障害者群では腸内細菌叢の多様性が低下し、短鎖脂肪酸濃度も減少していた。また、栄養摂取形態別の解析では、経管栄養群でギ酸やコハク酸の濃度が有意に異なり、生物学的年齢が経口摂取群よりも高いことが示された。これらの結果は、経管栄養が腸内環境の変化および老化の進行に影響を与える可能性を示唆している。

## 1. 研究の目的

本研究の目的は、長期にわたって経管栄養を受けている方における腸内細菌叢の変化および加齢への影響を解明することである。

我が国では、経口摂取が困難な高齢者に対して経管栄養療法が広く行われているが、短期的な栄養改善に寄与する一方で、その長期的影響については十分に明らかにされていない。特に、経管栄養では食形態が経口摂取と大きく異なるため、腸管での代謝吸収や腸内細菌叢に与える影響が不可避である。また、経管栄養の継続が老化に及ぼす影響についても、依然として未解明の領域である。

近年、老化研究の分野では「暦年齢」だけでなく「生物学的年齢」という概念が注目を集めている。この「生物学的年齢」は DNA メチル化や遺伝子発現を基にした予測法によって算出され、個人の老化状態をより精密に評価することが可能である。さらに、「生物学的年齢」は食事や運動などのライフスタイルにより変化することが知られているが、経管栄養がこれに与える影響については明らかにされていない。

以上の背景を踏まえ、本研究では、長期的な経管栄養が腸内細菌叢を乱し、生物学的年齢を加速させる可能性があるという仮説を検証することを目的とした。対象者として、生後から長期入院を続ける重症心身障害者を選定し、解析をすすめた。

## 2. 研究方法と経過

## 2-1 対象と栄養成分評価

本研究では、重症心身障害者 47 名、健常被験者 47 名を対象とした。重症心身障害者の内訳は、経口摂取者 18 名と経管栄養者 29 名である。経管栄養を受けている 29 名のうち、10 名は天然濃厚流動食を使用しており、19 名は人工濃厚流動食を使用していた。検体採取の前後 2 週間にわたり、対象者の食事内容および経腸栄養の種類と量を記録し、これを基に栄養状態の評価を行った。また健常被験者については BDHQ 食事調査票を用いて評価した。

## 2-2 腸内細菌叢解析

市販の採便キットを用いて便を採取、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。全検体の採取が完了した後、便試料から DNA を抽出し、その品質評価を実施した。次に、高速シーケンサーを用いて 16S rRNA シーケンスを行い、腸内細菌叢の種類と比率を解析するとともに、細菌叢の機能的特性についても検討した。さらに、LC-MS を用いた短鎖脂肪酸解析を実施した。

## 2-3 遺伝子発現解析

PAXgene Blood RNA Kit を用いて末梢血から RNA を抽出し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。全検体の RNA 収集が完了した後、RNA シーケンシングを実施し、発現変動遺伝子を同定するとともに、それらの遺伝子に関連する機能の解析を行った。

## 2-4 生物学的年齢解析

遺伝子発現データを基に生物学的年齢を推定するため、RNAAgeCalc ツールを使用した。RNAAgeCalc は R プログラミング環境で動作するツールであり、2-3 で得られた正規化済み遺伝子発現データを入力として、生物学的年齢を算出した。

## 3. 研究の成果

### 3-1 被験者の特性と栄養成分評価

重症心身障害者群は平均年齢 15 歳 (2~30 歳)、男性比率 46.8%、BMI 13.8 であった。一方、健常群は平均年齢 15 歳 (3~30 歳)、男性比率 51.1%、BMI 18.8 であった。便の状態を示す Bristol スコアは、重症心身障害者群で 4.7、健常群では 3.2 であった。

栄養成分の評価では、重症心身障害者群の摂取量は、総エネルギー 1192kcal、タンパク質 38g/1000kcal、脂質 30g/1000kcal、炭水化物 142g/1000kcal、食物繊維 11g/1000kcal であった。健常群の摂取量は、総エネルギー 1789kcal、タンパク質 36g/1000kcal、脂質 33g/1000kcal、炭水化物 134g/1000kcal、食物繊維 6g/1000kcal であった。

重症心身障害者群では、総エネルギー摂取量は健常群に比べて有意に低かったが、主要栄養素の比率には大きな違いが認められなかった。

### 3-2 腸内細菌叢解析

アルファ多様性解析の結果、重症心身障害者群では、健常群と比較して腸内細菌叢の多様性が有意に低下していた。また、ベータ多様性解析でも、両群の腸内細菌叢の構成には顕著な差異が認められた。

菌種の構成に関して、重症心身障害者群では *Bacteroides* が多く認められた一方、*Bifidobacterium* の割合は低かった。さらに、軟便に関連する *Klebsiella* や *Escherichia coli* が検出された。

短鎖脂肪酸は腸内細菌の代謝活動によって生成される有機酸であり、腸内環境の維持に寄与すると考えられている。短鎖脂肪酸の解析では、重症心身障害者群において酢酸およびプロピオン酸の濃度が有意に低下していた。また、重症心身障害者の経口摂取群と経管栄養 (人工濃厚流動食) 群を比較した結果、ギ酸、コハク酸、乳酸の濃度に有意な差異が認められた。

### 3-3 生物学的年齢解析

重症心身障害者群では、健常群と比較して腸内細菌叢や短鎖脂肪酸産生に大きな差異が認められた。さらに、重症心身障害者群の中でも、経口摂取群と経管栄養 (人工濃厚流動食) 群においても顕著な違いが観察されたことから、栄養摂取形態が加齢に与える影響について検討を行った。

遺伝子発現データを基に生物学的年齢を推定するため、RNAAgeCalc を用いた解析を実施した。その結果、経口摂取群の暦年齢は平均 20 歳、生物学的年齢は平均 31 歳であった。一方、経管栄養 (人工濃厚流動食) 群の暦年齢は平均 20 歳、生物学的年齢は平均 32 歳であった。この結果は、経管栄養 (人工濃厚流動食) 群では経口摂取群に比べて、生物学的年齢が平均 1 歳高く、老化が進行している可能性を示唆している。

## 4. 今後の課題

本研究では、長期入院中の重症心身障害者を対象とし、環境因子の影響を可能な限り軽減するよう努めた。しかし、重症心身障害の主な原因は出産時のトラブルであるものの、その背景は多岐にわたるため、疾患の多様性が本研究結果に影響を及ぼしている可能性は否定できない。

また、生物学的年齢解析については、近年、DNA メチル化を基盤とした推定法が広く活用されていることから、今後は DNA メチル化を用いた生物学的年齢の解析を進め、より多角的な評価を試みたいと考えている。

さらに、本研究期間中に代表研究者が異動する事態が発生し、新たな研究室の立ち上げや倫理委員会への研究計画の再申請といった予期しない事象への対応が必要となった。そのため、一部の研究方法を当初の計画から変更せざるを得ない状況となったが、これにより得られたデータの信頼性や妥当性については引き続き慎重に検証していく予定である。

## 5. 研究成果の公表方法

現在解析をまだ続けているが、本研究で得られた知見については、国内外の学会における発表および査読付き国際学術誌への論文投稿を通じて公表する予定である。これにより、研究成果を広く共有し、関連分野の発展に寄与することを目指す。

# Investigation into the effects of long-term enteral nutrition on gut microbiota and age-related changes

**Primary Researcher:** Ryo Kimura  
Professor, United Graduate School of Child Development,  
Osaka University

**Co-researchers:** Ryo Inoue  
Professor, Department of Applied Biological Sciences,  
Setsunan University  
Kiyotaka Tomiwa  
Pediatric Neurologist, Todaiji Ryoiku Hospital for Children

## Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of long-term enteral nutrition on gut microbiota and aging in individuals with severe motor and intellectual disabilities (SMID). In Japan, enteral nutrition therapy is widely implemented for elderly individuals with difficulties in oral intake. While effective for short-term nutritional improvement, its long-term effects remain unclear. This study hypothesized that prolonged enteral nutrition disrupts the gut microbiota and accelerates aging. A total of 47 individuals, including SMID patients and healthy controls, participated in the study. Gut microbiota diversity and short-chain fatty acid (SCFA) concentrations were analyzed using 16S rRNA sequencing and LC-MS. The results revealed that the SMID group exhibited significantly reduced gut microbiota diversity and lower SCFA concentrations compared to the healthy controls. Furthermore, analysis based on nutritional intake methods showed significant differences in formic acid and succinic acid concentrations between enteral nutrition and oral intake groups. Biological age, as assessed in this study, was higher in the enteral nutrition group than in the oral intake group. These findings suggest that long-term enteral nutrition may influence gut microbiota composition and contribute to accelerated aging.

## 1. Aim of Research

The objective of this study is to elucidate the effects of long-term enteral nutrition on gut microbiota and aging. In Japan, enteral nutrition therapy is widely administered to elderly individuals with difficulties in oral intake. While effective in improving short-term nutritional status, its long-term effects remain insufficiently understood. Notably, the physical properties of enteral nutrition differ substantially from those of oral intake, inevitably impacting intestinal metabolism and gut microbiota. Moreover, the effects of prolonged enteral nutrition on aging remain an unexplored area. In recent years, the concept of "biological age," which goes beyond chronological age, has garnered attention in aging research. Biological age is estimated using methods based on DNA methylation and gene expression, enabling more precise assessments of individual aging status. Furthermore, biological age is known to be

influenced by lifestyle factors such as diet and exercise. However, the impact of enteral nutrition on biological age has not been clarified.

Against this background, this study aims to test the hypothesis that long-term enteral nutrition disrupts gut microbiota and accelerates biological aging. The study focuses on individuals with severe motor and intellectual disabilities (SMID) who have been hospitalized since infancy, with analyses conducted to investigate these effects.

## 2. Method of Research & Progression

### 2-1 Subjects and Nutritional Assessment

This study included 47 individuals with SMID and 47 healthy controls. Among the SMID participants, 18 were on oral intake, while 29 were on enteral nutrition. Of the 29 receiving enteral nutrition, 10 were on

natural nutrient-rich liquid diets, and 19 were on artificial nutrient-rich liquid diets. Dietary records, including the type and amount of enteral nutrition, were collected for two weeks before and after sample collection to evaluate nutritional status. Nutritional assessments for the healthy control group were conducted using the BDHQ dietary questionnaire.

#### 2-2 Gut Microbiota Analysis

Stool samples were collected using commercial kits and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After all samples were collected, DNA was extracted from the stool specimens, and quality assessment was performed. 16S rRNA sequencing was conducted using a high-speed sequencer to analyze the composition and ratios of gut microbiota, as well as to investigate their functional characteristics. Additionally, short-chain fatty acid (SCFA) analysis was performed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

#### 2-3 Gene Expression Analysis

RNA was extracted from peripheral blood samples using the PAXgene Blood RNA Kit and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After completing the RNA collection for all samples, RNA sequencing was conducted to identify differentially expressed genes and analyze their associated functions.

#### 2-4 Biological Age Analysis

Biological age was estimated using the RNAAgeCalc tool, which operates within the R programming environment. Normalized gene expression data obtained in Section 2-3 were used as input for calculating biological age.

### 3. Results of Research

#### 3-1 Characteristics of Participants and Nutritional Assessment

The group of individuals with SMID had an average age of 15 years (range: 2–30 years), with 46.8% being male, and an average BMI of 13.8. In contrast, the healthy control group had an average age of 15 years (range:

3–30 years), with 51.1% being male, and an average BMI of 18.8. The Bristol Stool Scale scores, indicating stool condition, were 4.7 for the SMID group and 3.2 for the control group.

In terms of nutritional assessment, the SMID group had an average intake of 1192 kcal of total energy, 38 g/1000 kcal of protein, 30 g/1000 kcal of fat, 142 g/1000 kcal of carbohydrates, and 11 g/1000 kcal of dietary fiber. For the healthy controls, the average intake was 1789 kcal of total energy, 36 g/1000 kcal of protein, 33 g/1000 kcal of fat, 134 g/1000 kcal of carbohydrates, and 6 g/1000 kcal of dietary fiber. Although the total energy intake in the SMID group was significantly lower than that in the control group, the ratios of major nutrients were not markedly different.

#### 3-2 Gut Microbiota Analysis

Alpha diversity analysis revealed that the gut microbiota diversity was significantly lower in the SMID group compared to the control group. Beta diversity analysis also showed distinct differences in the gut microbiota composition between the two groups.

Regarding bacterial composition, the SMID group exhibited a higher prevalence of *Bacteroides* and a lower prevalence of *Bifidobacterium* compared to the controls. Additionally, bacteria associated with loose stools, such as *Klebsiella* and *Escherichia coli*, were detected in the SMID group.

SCFAs, which are organic acids produced through gut microbiota metabolism and are considered important for maintaining intestinal health, were analyzed. The concentrations of acetate and propionate were significantly lower in the SMID group. Furthermore, a comparison between the oral intake and enteral nutrition (artificial nutrient-rich liquid diet) groups within the SMID population showed significant differences in the concentrations of formic acid, succinic acid, and lactic acid.

#### 3-3 Biological Age Analysis

The SMID group showed notable differences in gut microbiota and SCFA production

compared to the control group. Within the SMID group, significant differences were observed between the oral intake and enteral nutrition (artificial nutrient-rich liquid diet) groups, prompting an investigation into the effects of nutritional intake methods on aging.

Biological age was estimated using the RNAAgeCalc tool based on gene expression data. The results showed that the oral intake group had an average chronological age of 20 years and an average biological age of 31 years. In comparison, the enteral nutrition (artificial nutrient-rich liquid diet) group had an average chronological age of 20 years and an average biological age of 32 years. These findings suggest that biological aging may progress more rapidly in the enteral nutrition group compared to the oral intake group.

#### **4. Future Area to Take Note of, and Going Forward**

This study focused on individuals with SMID who were hospitalized long-term, aiming to minimize the influence of environmental factors. However, while the primary cause of SMID is often complications during childbirth, the underlying conditions vary widely. This diversity may have influenced the study's results and cannot be entirely ruled out.

Regarding biological age analysis, recent advancements have seen widespread use of

methods based on DNA methylation for estimating biological age. Moving forward, incorporating DNA methylation-based analyses will allow for a more comprehensive evaluation of biological aging.

Additionally, during the course of this study, the principal investigator relocated to a new institution, necessitating the establishment of a new laboratory and the resubmission of research protocols to the ethics committee. Addressing these unforeseen circumstances required modifications to certain aspects of the original research methods. The reliability and validity of the resulting data will continue to be rigorously evaluated to ensure the integrity of the study's findings.

#### **5. Means of Official Announcement of Research Results**

Although data analysis is still ongoing, the findings of this study are planned to be disseminated through presentations at domestic and international conferences and publications in peer-reviewed international journals. These efforts aim to widely share the research outcomes and contribute to the advancement of related fields.

# Investigation into the effects of long-term enteral nutrition on gut microbiota and age-related changes

**Primary Researcher:** Ryo Kimura  
Professor, United Graduate School of Child Development,  
Osaka University

**Co-researchers:** Ryo Inoue  
Professor, Department of Applied Biological Sciences,  
Setsunan University  
Kiyotaka Tomiwa  
Pediatric Neurologist, Todaiji Ryoiku Hospital for Children

The aim of this study was to investigate the effects of long-term enteral nutrition on gut microbiota and aging in individuals with severe motor and intellectual disabilities (SMID). In Japan, enteral nutrition therapy is widely implemented for elderly individuals with difficulties in oral intake. While effective for short-term nutritional improvement, its long-term effects remain unclear. This study hypothesized that prolonged enteral nutrition disrupts the gut microbiota and accelerates aging. A total of 47 individuals, including SMID patients and healthy controls, participated in the study. Gut microbiota diversity and short-chain fatty acid (SCFA) concentrations were analyzed using 16S rRNA sequencing and LC-MS. The results revealed that the SMID group exhibited significantly reduced gut microbiota diversity and lower SCFA concentrations compared to the healthy controls. Furthermore, analysis based on nutritional intake methods showed significant differences in formic acid and succinic acid concentrations between enteral nutrition and oral intake groups. Biological age, as assessed in this study, was higher in the enteral nutrition group than in the oral intake group. These findings suggest that long-term enteral nutrition may influence gut microbiota composition and contribute to accelerated aging.