

小児および思春期の起立性調節障害患者における抑うつ・不安と腸内フローラに関する検討

日本大学大学院医学研究科博士課程内科系小児科学専攻
石井 和嘉子

1. 背景

1.1 小児心身症としての起立性調節障害

起立性調節障害 (orthostatic dysregulation: OD) は心身症の代表である¹。OD の病態は自律神経の機能不全であり²⁻⁴、身体の成長に比較して自律神経機能の発達が未熟な時期、つまり中高生に多く発症する^{2,5,6}。

OD の症状は、自律神経系の過活動や活動低下により、繰り返す眩暈、倦怠感、頭痛、腹痛、失神など多彩である^{2,4}。重症例では起床困難となり、遅刻や欠席の原因となる。本邦では、OD の過半数が不登校に至るといわれている^{7,8}。OD には抑うつや不安がしばしば合併し、それらは抑うつや不安が OD 症状の増悪に影響する。

OD の治療には、循環血漿量の増加を促す目的での水分・塩分摂取の励行、適度な運動、生活リズムの改善についての指導などを含む非薬物療法、薬物療法 (昇圧薬、遮断薬など) がある。さらに心身症の側面をもつ OD に対しては身体症状の治療だけでなく、抑うつや不安の軽減など心理的介入も不可欠である。しかし、心理的介入が可能な施設は限られている。

近年、成人領域において、抑うつ・不安と腸内フローラのバランス失調の関与が報告されている。加えて、抑うつや不安に対するプロバイオティクスの補充療法が有効であるという臨床研究もある¹¹⁻¹⁴。しかし、PubMed 上では OD のメンタルヘルスと腸内環境に関する先行研究は存在しない。

1.2 腸内フローラ

ヒトには、約 1000 種の細菌が、口腔、鼻腔、胃、小腸、大腸、皮膚、膣など全身に生息し、固有の細菌叢を形成している^{15,16}。近年、16S rRNA 遺伝子を対象とした次世代シーケンサーやメタゲノム解析を含む網羅的なゲノム解析の発展により、生体の常在菌に関する研究が飛躍的に発展した。

消化管には、 10^{12} ~ 10^{14} 個の様々な細菌や真菌が存在し、複雑なコミュニティーである腸内フローラを形成している^{17,18}。消化管機能は、中枢神経系 (Central nervous system: CNS) のうち自律神経系の主に交感神経系により制御される。一方で、腸管組織局所では細菌自体もホルモン、サイトカイン、神経伝達物質などの産生を介して CNS に影響を与え、気分、行動、認知の制御に関与すること

が知られている¹⁹⁻²¹。例えば、*Bifidobacterium infantis* は、セロトニンの前駆体であるトリプトファン値を上昇させることで、間接的にセロトニン産生に携わっている^{22,23}。CNS と消化管の双方向性のネットワークは、「腸脳相関」と呼ばれ^{19, 24, 25}、さらに、この多面的なネットワークにおける腸内細菌の重要性から、脳-腸-腸内細菌軸 (brain-gut-microbiota axis) といった概念も提唱されている²⁴⁻²⁶。

2. 目的

近年、成人抑うつ・不安患者における腸内細菌のバランス失調が報告されているが²⁷、小児での報告は稀である。本研究では、抑うつ・不安を合併しやすいOD患者の腸内フローラの構成を健常者と比較すること、そのバランス失調に抑うつ・不安が関与しているかを調べることを目的とした。

3. 対象と方法

3.1 対象

この研究は、ヘルシンキ宣言の改訂版に則り、日本大学板橋病院の臨床研究倫理審査委員会により承認された(RK-160510-01)。対象は、2016年7月から2018年1月までに、日本大学医学部附属板橋病院の小児科外来で、ガイドライン^{1,2}に従ってODと診断した18歳未満の患者のうち、本人と保護者から文書によるインフォームド・コンセントが得られた患者とした。2週間以内に抗菌薬や整腸薬を服薬したもの、感染性腸炎に罹患しているもの、炎症性腸疾患、摂食障害などの基礎疾患のある患者は除外した。健常コントロールは問診により、健康でかつ心理的問題がなく、OD症状や家族歴のないものとした。OD患者56名(平均 13.6 ± 1.6 歳)と健常コントロール9名(平均 12.3 ± 3.8 歳)を対象とした。

3.2 OD患者の抑うつ・不安の評価

OD患者について、小児抑うつ尺度(Children's Depression Inventory: CDI)^{28, 29}と児童顕在性不安尺度(Children Manifest Anxiety Scale: CMAS)^{30, 31}を用いて抑うつと不安を評価した。CDI22点以上を抑うつ²⁹、CMAS21点以上を不安と定義し³¹、OD患者を抑うつ群/非抑うつ群と不安群/非不安群に分類した。

3.3 臨床情報の取得

参加者の身長、体重を測定し、Body Mass Index(BMI)を算出した。また、質問紙を用いて、性別、年齢、腹痛や便秘異常、不登校、偏食の有無、乳酸菌飲料および発酵食品の嗜好の有無、分娩様式や乳幼児期の主たる栄養源、初乳摂取の有無などの産期歴、乳児期における抗菌薬の使用歴を収集した。

3.4 糞便サンプル

全参加者から糞便サンプルを採取し、QIAamp DNA stool Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いて腸内細菌の DNA を抽出した。

3.5 Terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP)解析

T-RFLP 解析は 16S rRNA 遺伝子を増幅する PCR 法を利用した、簡便かつ再現性の高い解析手法で³²、そのうち Nagashima 法³³は、ほぼ同じサイズのフラグメント長のことを Operational Taxonomic Unit (OTU) と定義し、腸内細菌を 29 クラスターの属から目レベルの系統分類群に分類し、相対比を数値化する方法である。本研究では、T-RFLP 解析(Nagashima 法) をテクノスルガラボ (Shizuoka, Japan)に委託した。

3.6 統計学的解析

T-RFLP 解析で得られた相対値は、群ごとに平均値±標準偏差で表示した。OTU 値を用いて、Shannon-Wiener index と Simpson index を算出し、多様性を比較した³⁴。2 群間比較は Fisher's exact test および Mann-Whitney U test を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。データは、Statcel 4 (OMS Publishing Inc., Tokorozawa, Japan)で解析した。

4. 結果

4.1 OD 患者と健常コントロールの臨床情報についての比較

OD 患者と健常コントロールの臨床情報の比較では、OD 患者における腹痛と不登校児の人数は健常コントロールに比し有意に多く観察された (それぞれ $p = 0.00004$ 、 $p = 0.0002$)。また OD 患者の 26.8%に抑うつ傾向を認め、58.9%に不安を認めた。

4.2 OD 患者と健常コントロールの糞便中のフローラ解析の比較

OD 患者と健常コントロールの間で、糞便中の T-RFLP 解析から得られた 29 クラスターの OTUs の相対値を比較した。*Clostridium* subcluster XIVa and/or *Enterobacteriaceae* [OTU940] は、OD 群 (5.21 ± 6.40) がコントロール群 (2.41 ± 4.54) より有意に高かった ($p = 0.02$)。他の 28 クラスターでは、2 群間に有意差は認めなかった。

4.3 OD 患者における糞便中のフローラの便通異常との関係

OD 患者で便通異常を認めたものは 56 名中 16 名であった。OD 患者を便通異

常の有無で 2 群に分類し、29 クラスターの OTUs の相対値を比較したところ、2 群間に有意差は認めなかった。

4.4 OD 患者における糞便中のフローラの抑うつ・不安との関係

次に OD 患者を抑うつ群と非抑うつ群、不安群と非不安群に分けて、糞便中のフローラ (29 クラスターの OTUs) を健常コントロールと比較した (図 4)。

非抑うつ群における *Bifidobacterium* [OTU124] (2.66 ± 3.18) は、抑うつ群 (0.67 ± 0.92) と比較して有意に高値であった ($p=0.006$)。不安において有意差を認めた OUT は存在しなかった。

4.5 糞便中のフローラの多様性

次に、OD 患者と健常コントロールの糞便中のフローラの多様性を、Shannon-Wiener index と Simpson index を用いて比較したが、いずれも、抑うつや不安の有無において有意差は認めなかった。さらに、性別、体型、発酵食品や乳酸菌飲料の嗜好、抗菌薬使用歴などの臨床情報の比較でも多様性に有意差は認めなかった。

5. 考察

OD は小児期・思春期の不登校や引きこもりなどの社会的現象の要因として重要な疾患である。近年、成人うつ患者の病態生理に腸内細菌のバランス失調が関与することが報告されている^{27, 35-38}。本研究により、小児期・思春期の心身症の代表である OD 患者において腸内フローラのバランス失調が観察され、中でも抑うつを伴う OD では有益菌の代表である *Bifidobacterium* が有意に少ないことが明らかになった。

Bifidobacterium は、脳内で抑制性の神経伝達物質として働く GABA(γ アミノブチリク酸)産生に関与することが分かっている^{24, 39}。また、*Bifidobacterium* を含むプロバイオティクスがヒトやラットの精神状態を改善することが知られている^{13, 40}。この効果は、腸内の有害な病原体の競合的な除外、炎症性サイトカインの抑制などで説明されている⁴¹⁻⁴³。本研究では、抑うつを伴う OD 患者において、腸内細菌に占める *Bifidobacterium* の割合が低下していることを明らかにした。この結果は、*Bifidobacterium* が小児のメンタルヘル스에重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

OD 患者の腸内フローラに占める *Clostridium* subcluster XIVa and/or *Enterobacteriaceae* [OTU940] の割合は健常コントロール群に比し有意に高かった。ただし、[OTU940]を構成する 2 つの菌のうちいずれが多いかについては、T-RFLP 解析では鑑別が不可能であった。*Clostridium* subcluster XIVa には、

ヒトの消化管内で短鎖脂肪酸である酪酸を産生する菌株が多く含まれ^{44, 45}、*Enterobacteriaceae* は一般にヒト腸内の正常フローラを構成する細菌で、大腸菌、サルモネラ菌などを含む⁴⁶。うつ病の患者では、*Enterobacteriaceae* が健常コントロールより増加したという報告がある²⁷。

フローラの多様性の比較では、健常コントロールと OD 群の間に有意差は認めず、さらに抑うつ・不安と多様性の間に有意な相関はなかった。多様性は、年齢、食生活、抗生剤治療歴、妊娠などにより影響を受けるが⁴⁷、成人のうつ病と多様性には、一定の見解は得られていない^{27, 37}。本研究で聴取した臨床情報のいずれも多様性に関連は認めなかった。

本研究の限界として、対象群の集団が小さく多変量解析を行うことができなかったこと、コントロール群の集団が小さいこと、今回用いた DNA 抽出キットは細胞壁の厚いグラム陽性菌の検出効率が悪いこと、糞便のフローラが真の腸内フローラと同等とはいえない可能性があること、検体の採取は 1 回のみであり、採取当日の食事内容や生活スタイルによっても変化する可能性があること、フローラの総菌数を測定できないことなどがあげられる。今後、DNA 抽出キットの変更、同一患者の複数回のサンプル採取で再現性を確認すること、積極的なプロバイオティクス介入による変化の比較などを計画している。

6. 結論

本研究により、小児期・思春期の OD 患者において腸内フローラのバランス失調、特に、抑うつを伴う OD で有益菌の一つである *Bifidobacterium* の割合の減少が明らかになった。腸内環境の調整は、従来の薬物療法および心理療法に難渋する OD 患者において新しい治療戦略となる可能性がある。

引用文献

1. 日本小児心身医学会. 小児起立性調節障害 診断・治療ガイドライン. 小児心身医学会ガイドライン集 (改定第2版)—日常診療に活かす5つのガイドライン. 南江堂, 東京, 2015: 25-85.
2. Tanaka H, Fujita Y, Takenaka Y, et al. Japanese clinical guidelines for juvenile orthostatic dysregulation version 1. *Pediatr Int* 2009; **51**: 169-179.
3. Bruck K, Oltmann D. Diagnosis and therapy of orthostatic regulatory dysfunction in children; examination of the preparation carnigen. *Monatsschr Kinderheilkd* 1957; **105**: 7-12.
4. Okuni M. Orthostatic dysregulation in childhood with special reference to the standing electrocardiogram. *Jpn Circ J* 1963; **27**: 200-204.
5. 田中英高. 起立性調節障害の子どもの正しい理解と対応 中央法規出版, 東京, 2009; 11-14.
6. 日本学校保健会. 児童生徒の健康状態サーベイランス報告書. 日本学校保健会 2004.
7. Nozawa I, Hisamatsu K, Imamura S, et al. Psychosomatic aspects of healthy young women with orthostatic dysregulation. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1996; **21**: 222-225.
8. Tanaka H Yamaguchi H, Takenaka Y, et al. School refusal or orthostatic dysregulation? Psychosomatic diagnosis by orthostatic test with Finapres and treatment outcome in Japanese school absentees. *J Jpn Soc Psychosom Pediatr* 1999;**7**:125-130.
9. 大国真彦. 起立性調節障害. 現代小児科学大系. 中山書店, 東京. 1971; 324-336.
10. 藤井由里, 石崎優子, 谷内昇一郎ら. 起立性障害児の長期予後に関する調査. *小児科臨床*, 2004; **57**: 1029-1932.
11. Luna RA, Foster JA. Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. *Curr Opin Biotechnol* 2015; **32**: 35-41.
12. Vlainic JV, Suran J, Vlainic T, et al. Probiotics as an Adjuvant Therapy in Major Depressive Disorder. *Curr Neuropharmacol* 2016; **14**: 952-958.
13. Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *The British journal of nutrition* 2011;**105** :755-764.

14. Benton D, Williams C, Brown A. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *Eur J Clin Nutr* 2007; **61**: 355-361.
15. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; **486**: 207-214.
16. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012; **148**: 1258-1270.
17. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; **124**: 837-848.
18. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York)* 2006; **312**: 1355-1359.
19. Foster JA, Rinaman L, Cryan JF. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress* 2017; **7**: 124-136.
20. Huo R, Zeng B, Zeng L, et al. Microbiota Modulate Anxiety-Like Behavior and Endocrine Abnormalities in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; **7**: 489.
21. Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 2013; **36**: 305-312.
22. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 2010; **170**: 1179-1188.
23. Arneith BM. Gut-brain axis biochemical signalling from the gastrointestinal tract to the central nervous system: gut dysbiosis and altered brain function. *Postgraduate medical journal* 2018; **94**: 446-452.
24. Dinan TG, Cryan JF. Brain-Gut-Microbiota Axis and Mental Health. *Psychosom Med* 2017; **79**: 920-926.
25. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; **6**: 306-314.
26. Burokas A, Moloney RD, Dinan TG, et al. Microbiota regulation of the Mammalian gut-brain axis. *Advances in applied microbiology* 2015; **91**: 1-62.
27. Jiang H, Ling Z, Zhang Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, behavior, and immunity* 2015; **48**: 186-194.
28. Kovacs M. Rating scales to assess depression in school-aged children. *Acta paedopsychiatrica* 1981; **46**: 305-315.

29. 村田 豊久, 堤 竜喜, 皿田 洋子ら. 児童・思春期の抑うつ状態に関する臨床的研究(2) CDI を用いての検討. 厚生省精神・神経疾患研究委託費研究報告書 児童・思春期精神障害の成因及び治療に関する研究 昭和 63 年度. 1989: 69-76.
30. Castaneda A, McCandless BR, Palermo DS. The children's form of the manifest anxiety scale. *Child development* 1956; **27**: 317-326.
31. 坂本龍生. 日本版児童用顕在性不安検査 CMAS 使用手引. 三京房, 京都. 3-15.
32. Liu WT, Marsh TL, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 1997; **63**: 4516-4522.
33. Nagashima K, Hisada T, Sato M, et al. Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Applied and environmental microbiology* 2003; **69**:1251-1262.
34. Hill MO. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 1973; **54**: 427-432.
35. MacQueen G, Surette M, Moayyedi P. The gut microbiota and psychiatric illness. *J Psychiatry Neurosci* 2017; **42**:75-77.
36. Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, et al. Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol* 2016; **22**: 361-368.
37. Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, et al. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil* 2014; **26**: 1155-1162.
38. Aizawa E, Tsuji H, Asahara T, et al. Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* 2016; **202**: 254-257.
39. Lyte M. Microbial endocrinology and the microbiota-gut-brain axis. *Advances in experimental medicine and biology* 2014; **817**: 3-24.
40. Jang HM, Jang SE, Han MJ, et al. Anxiolytic-like effect of Bifidobacterium adolescentis IM38 in mice with or without immobilisation stress. *Benef Microbes* 2018; **9**: 123-132.
41. Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, et al. Mood and gut feelings. *Brain, behavior, and immunity* 2010; **24**: 9-16.
42. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced

apoptosis in intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**: 50959-50965.

43. Ramiah K, van Reenen CA, Dicks LM. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research in microbiology* 2008; **159**: 470-475.

44. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and environmental microbiology* 2000; **66**: 1654-1661.

45. Takeshita K, Mizuno S, Mikami Y, et al. A Single Species of *Clostridium* Subcluster XIVa Decreased in Ulcerative Colitis Patients. *Inflamm Bowel Dis* 2016; **22**: 2802-2810.

46. Jenkins C, Rentenaar RJ, Landraud L, Brisse S. 180 - Enterobacteriaceae. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, eds. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*: Elsevier; 2017: 1565-1578.e1562.

47. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science (New York)* 2016; **352**: 565-569.