

機能性便秘症を伴う下部尿路障害を有する小児における腸内細菌叢の検討

昭和大学藤が丘病院小児科

石川琢也、池田裕一、布山正貴、小川玲、藤本陽子

下部尿路障害の児における腸内細菌叢の検討

石川琢也

昭和大学藤が丘病院小児科

〒227-850 神奈川県横浜市青葉区藤が丘 1-30

昭和大学藤が丘病院 小児科

Tel : 045-971-1151

抄録：ヒトの腸管内には多くの細菌が生息しており腸内細菌叢を形成している。近年、腸内細菌叢の変化と様々な疾患との関係性が報告されている。今回、我々は機能性便秘症を伴う下部尿路障害の児における腸内細菌叢の分布を調査することとした。機能性便秘症を伴う下部尿路障害の児 10 名（男児 8 例女児 2 例、平均年齢 8.1 歳）と健常児 10 名（男児 10 名、平均年齢 7.1 歳）の腸内細菌を検索した。検索は培養法で行い、4 菌種を評価項目とした。その結果、機能性便秘症を伴う下部尿路障害の児では *Clostridium* 属と *Lactobacillus* 属が有意に増加しており ( $p < 0.05$ )、その他の菌種や総菌数では有意差は認めなかった。腸内細菌叢の変化が排尿排便機能に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆され、プロバイオティクスによって基礎疾患とともに下部尿路障害の改善に期待がもたれる。

キーワード：下部尿路障害、過活動膀胱、腸内細菌叢、プロバイオティクス

## 緒言

ヒトの腸管内には約 100 兆個もの細菌が生息している。これらの細菌は腸内細菌叢 (microbiome) と呼ばれる集団を形成し、宿主であるヒトと共生関係を築いている<sup>1)</sup>。

ヒトの腸内細菌叢は、主に *Firmicutes* 門、*Bacteroides* 門、*Actinobacteria* 門、*Proteobacteria* 門から構成され、*Firmicutes* 門と *Bacteroides* 門が最優占菌種である<sup>2)</sup>。*Firmicutes* 門は主に *Lactobacillus* 属・*Clostridium* 属が多く含まれ、*Actinobacteria* 門

には *Bifidobacterium* 属が含まれている。近年、腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) が、様々な疾患の発症と関連していることが分かってきた。小児領域でも dysbiosis との関連性に関する報告が増えており、腎・泌尿器疾患では、末期腎不全で腹膜透析を受けている児では *Firmicutes* 門と *Actinobacteria* 門が低下し、血液透析を受けている児で *Bacteroides* 門が増加しているという報告<sup>3)</sup>や、高度膀胱尿管逆流を有する乳児の尿路感染症では分娩様式と腸内細菌との関連が示唆されるといった報告<sup>4)</sup>があるが、下部尿路障害との関連についてはまだ検討されていない。そこで今回、我々は下部尿路異常の児において、腸内細菌叢が健常児と比べて異なるかを比較検討することとした。

## 研究方法

2020年1月から2020年12月までに当院小児科外来を受診した5歳以上15歳以下の小児のうち、内服歴なく RomeIII 基準を満たした機能性便秘症を伴う下部尿路障害の児を患者群 (P 群)、内服歴なく特に消化器症状を有さない健常児を Control 群 (C 群) として腸内細菌叢を比較した。C 群は当院小児科スタッフの家族のうち、本人及び保護者の同意を得られた者とした。検体は被験者の糞便とし、P 群は外来初診時にグリセリン浣腸を用いて反応便を採取し、C 群は自然排便で得られた検体を採取した。その後、直ちに密栓・氷冷して LSI メディエンス(株)まで輸送し、光岡の方法<sup>5)</sup>に準じて腸内菌叢の検索を行い、糞便湿重量 1g 当りの菌数を対数で表した。評価項目は、培養法で検出

可能かつ幼児期以降の腸内細菌叢で多くを占める *Lactobacillus* 属、*Clostridium* 属、*Bifidobacterium* 属、*Bacteroides* 属、及び総菌数とした。統計学的検討は Mann-Whitney U test を行い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意とした。尚、本研究の倫理面の配慮については、厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針に則り、本人または代諾者である家族に十分説明をし同意を得た上で実施した。また、当院倫理委員会の承認の上（2019年9月30日、承認番号：F2018C87）、症例データに関しては匿名化をして個人が特定されないように配慮する等、厳重な管理の下で行った。

## 結果

2020年1月から2020年12月までに下部尿路障害を主訴に当院小児科外来を受診した児のうち、臨床研究に同意が得られ、かつ便検体を採取できたのは10例であった。患者背景を表1に示す。男児8例女児2例で、年齢平均は8.1歳（最小5歳-最大14歳）であった。10例全員が夜尿症や昼間尿失禁を認めており、過活動膀胱（overactive bladder：OAB）の児であった。診断は過活動膀胱ガイドラインに沿って行い、OABの定義を満たすもの、すなわち尿意切迫感を必須とし、頻尿と夜間頻尿を伴い、時に切迫性尿失禁を伴うものとした。基礎疾患としては、全例に機能性便秘症を認め、その他注意欠陥多動性障害（attention deficit/hyperactivity disorder；ADHD）2例、自閉症スペクトラム（autism spectrum disorder；ASD）2例、てんかん1例、ADHDとてんかん

の合併例が1例であった。

結果を表2に示す。腸内細菌数 (log CFU/g) は、*Lactobacillus* 属は P 群  $3.66 \pm 2.98$  (0-8.1)、C 群  $1.27 \pm 2.02$  (0-5.6) であり、P 群では C 群と比較して有意に多かった ( $p=0.031$ )。 *Clostridium* 属は P 群  $8.06 \pm 0.57$  (7.3-9.0)、C 群  $7.17 \pm 1.08$  (5.3-8.3) と、P 群では C 群と比較して有意に多かった ( $p=0.048$ )。 *Bifidobacterium* 属と *Bacteroides* 群、及び総菌数においては2群間に有意差はなかった(図)。

## 考察

ヒトの体において、細菌は皮膚・消化管・呼吸器系・口腔・膣などに存在しているが、細菌の約90%は消化管に定着して生息し腸内細菌叢と呼ばれている。この細菌集団は一定のバランスを保って生息し、消化・吸収・代謝・免疫等多方面でヒトと共生関係を築いている。

OAB は尿意切迫感を主症状とし、通常は頻尿を伴い、ときに切迫性尿失禁を伴う病態と定義される。小児における OAB の頻度は 17.8%と推定されている<sup>6)</sup>。尿意を感じ排尿するという下部尿路機能は膀胱・尿道・末梢神経・中枢神経の協調作用によって営まれている。則ち、尿意は膀胱からの求心性情報が脳に伝達されて感じるものであり、排尿は排尿するという指令が脳から遠心性情報として発信され、尿道括約筋の弛緩と膀胱の収縮によって開始される。したがって、OAB は蓄尿排尿に関する知覚・情報処

理機能の障害と言え、脳や神経の機能異常によっても生じ<sup>7)</sup>、ADHD や ASD の児では OAB を合併することが多いといわれる。神経発達症と腸内細菌の関わりも示唆されており<sup>8)9)</sup>、Sudo らは腸内細菌の違いによりストレス反応が異なること、また腸内細菌は脳内神経成長因子や神経伝達物質に影響を及ぼすと報告した<sup>10)</sup>。ASD 児では *Clostridium* 属の菌種が多いという報告<sup>11)</sup> や、ASD 群では健常児群と比較して神経毒を産生する *Clostridium histolyticum* が増えていたという結果も報告された<sup>12)</sup>。ASD や ADHD に対するプロバイオティクスでは、Hsiao らが自閉様行動をもつマウスモデルの腸内フローラでは *Bacteroides* 属や *Clostridium* 属の分布が異なっていたが、*Bacteroides fragilis* の投与によって、自閉症様行動や菌種の分布が改善することを報告している<sup>13)</sup>。健常者においての研究であるが、混合プロバイオティクス入りの乳製品飲料を 4 週間飲用させ、脳の機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を見た結果、情動表情を見たときの脳機能の変化が誘導され、プロバイオティクスは脳腸相関を介して脳機能を変容させることが示唆された<sup>14)</sup>。OAB が脳神経系の協調作用の障害が原因の一つと考えれば、*Clostridium* 属の増加が蓄尿排尿を営む神経系にも影響を及ぼしている可能性はある。慢性便秘患者の腸内細菌叢については、便秘患者では *Bacteroides* 門の有意な減少と、*Firmicutes* 門の増加を認めた報告<sup>15)</sup> や、*Bifidobacterium* 属や *Bacteroides* 属の減少を認めた報告がある<sup>16)</sup>。したがって、*Clostridium* 属の増加は機能性便秘症、ASD や ADHD といった基礎疾患によるものを見ている可能性はある。しかし、OAB の治療に

において基礎疾患のコントロールも重要であるため、直接的ではなくとも OAB に対するプロバイオティクスの有効性が期待できると考えられる。

*Lactobacillus* は宿主に有益な作用をもたらすとされ、近年ではこのような菌種を含む食品や薬剤を多くみかける。実際にアレルギー疾患や炎症性腸疾患の改善には *Lactobacillus* を含んだプロバイオティクスが有効と考えられている。一方で、有意に *Lactobacillus* 属の増加を認めた疾患もあり、過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome : IBS)<sup>17)</sup>、ASD<sup>18)</sup>、パーキンソン病 (Parkinson's disease : PD)<sup>19)</sup>、原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis : PSC)<sup>20)</sup> などの報告があるが、*Lactobacillus* 属の増加とこれらの疾患との因果関係ははっきりとはわかっていない。*Lactobacillus* はグルコースを乳酸に代謝する細菌であることから、乳酸とその代謝産物である酢酸・プロピオン酸の恒常性を超えた増加が IBS の源流であると推測されているのみである<sup>21)</sup>。PD や PSC においては、腸内細菌叢の異常による腸管粘膜の透過性亢進 (leaky gut) が発症の一因であると推測されているが、そこに関与している菌種はまだ同定できていない。

機能性便秘症を伴う OAB において *Lactobacillus* 属が増加しているという今回の結果は、便秘症による影響<sup>15)</sup>以外にどのように関与しているかは不明だが、*Lactobacillus* 属に関するプロバイオティクスについては、次のような研究がある。IBS 患者を対象にした研究であるが、プラセボ対プロバイオティクスの無作為比較臨床試験で、プラセボ投与群ならびに *Lactobacillus* 投与群では腹部症状は改善せず、*Bifidobacterium infantis* 投

与群で腹部症状（腹痛・膨満感）が改善している<sup>22)</sup>。IBSでは内臓知覚過敏があると推定されており、下部消化管の支配神経である骨盤神経や陰部神経は蓄尿排尿にも関わっていることから、OABにおいても *Bifidobacterium* 投与が何らかの効果を及ぼす可能性がある。通常の治療に加えてプラセボ対 *Bifidobacterium* の投与によるプロバイオティクスの比較対象試験を行うことで、腸内細菌による OAB への影響や、治療効果などが判明すると思われる。

今回用いた培養法では検出可能な菌種が限られ、また腸内細菌の多くを占める嫌気性菌の検出が不十分になりやすい。近年では次世代シーケンサーによるメタゲノム解析で属レベルではなく種レベルでの細菌検出も可能であるため、より詳細な腸内細菌の検索が行えると考えられる。

本検討の限界を二点述べる。一点目は、今回の検討が少数例であるため統計学的有意差の判断において誤差が否定できない点である。また、本研究では被験者が男児に偏っている点や、便検体の採取方法が異なっている点で選択バイアスが生じている可能性がある。特に、腸内細菌叢には性差があると言われ、今後は男児・女児の多数例での検討が望まれる。二点目は、疾患群が OAB 単独の病態ではなく基礎疾患を有しており、コントロール群を健常児としている点である。特に、OAB に合併頻度の高い機能性便秘症に関しては全例が有しており、*Clostridium* 属と *Lactobacillus* 属の増加も便秘症で増加している既知の腸内細菌と一致しているため、これらの菌種の増加が OAB と直接関



わりがあるかどうかは明らかではない。今後の課題としては、OAB を機能性便秘症や ASD・ADHD などの基礎疾患の有無で分類した上で腸内細菌叢を比較することが必要だと考えられる。ただし本研究で対象とした学童期においてプロバイオティクスによる介入を行った研究はほとんど見られなかった。そのため、プロバイオティクスの投与について有効な年齢があるのかどうか、または投与に慎重になるべき年齢があるのかどうかについては、今後の調査研究の結果の集積が待たれる。

#### 結語

機能性便秘症を伴う OAB の児の腸内細菌叢は、健常児と比較して *Clostridium* 属と *Lactobacillus* 属が増加していた。今回の研究では、この変化が OAB 単独の病態にどのような関与しているのかは不明である。しかし、既知の疾患と同様にプロバイオティクスによって基礎疾患を改善することで、OAB の症状改善が期待できると考えられる。症例数を増やして対象試験を行い、より詳細な腸内細菌叢の検索を行うことによって、OAB と腸内細菌の関わりが明らかになると考えられる。

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はありません。

## 文献

- 1) Qin J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59-65.
- 2) Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN *et al*. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308:1635-1638.
- 3) Crespo-Salgado J, Vehaskari VM, Stewart T *et al*. Intestinal microbiota in pediatric patients with end stage renal disease. *a Midwest Pediatric Nephrology Consortium study. Microbione*. 2016;4:50.
- 4) 木全貴久. 高度膀胱尿管逆流症のブレイクスルー感染症に寄与する因子の検討 分娩様式と新生児期の栄養法. 日本小児泌尿器科学会雑誌. 2019;28:10-14.
- 5) 光岡知足. 腸内細菌叢の検索手技. 感染症学雑誌. 1971;45:406-419.
- 6) Kajiwara M, Inoue K, Kato M *et al*. Nocturnal enuresis and overactive bladder in children. An epidemiological study. *Int.J Urol*. 2006;13:36-41.
- 7) Von Gontard A, Schmelzer D, Seifen S *et al*. Central nervous system involvement in nocturnal enuresis : Evidence of general neuromotor delay and specific brain dysfunction. *J.Urol*. 2001;166:2448-2451.
- 8) 三上克央. 腸内細菌と発達障害. 消化器心身医学. 2015;22:2-5.
- 9) 三上克央. 腸内フローラと自閉スペクトラム症. 分子精神医学. 2017;17:29-34.

- 10) Sudo N, Chida Y, Aiba Y *et al.* Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology.* 2004;558:263-275.
- 11) Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C *et al.* Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis.* 2002;35:S6-S16.
- 12) Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of child with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol.* 2005;54:987-991.
- 13) Hsiao EY, McBride SW, Hsien S *et al.* Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.* 2013;155:145-146
- 14) Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, *et al.* Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology.* 2013;144:1394 – 1401.
- 15) Tana C, Umesaki Y, Imaoka A *et al.* Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;22:512-519.
- 16) Zhu L, Liu W, Alkhouri R *et al.* Structural changes in the gut microbiome of

- constipated patients. *Physiol Genomics*. 2014;46:679-686.
- 17) Kim SE, Choi SC, Park KS *et al*. Change of Fecal Flora and Effectiveness of the Short-term VSL#3 Probiotic Treatment in Patients With Functional Constipation. *J Neurogastroenterol Motil*. 2015;21:111-120.
- 18) Adams JB, Johansen LJ, Powell LD *et al*. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:22.
- 19) Hasegawa S, Sae Goto, Hirokazu Tsuji *et al*. Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease. *PLoS One*. 2015;10:e0142164.
- 20) Sabino J. Primary sclerosing cholangitis is characterised by intestinal dysbiosis independent from IBD. *Gut*. 2016;65:1681-9.
- 21) 福土審. 腸内細菌と過敏性腸症候群. 日消誌. 2015;112:1956-1965.
- 22) O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P *et al*. Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome : symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*. 2005;128:541-551.

Gut microbiota in children with lower urethral disorders and functional constipation

Takuya Ishikawa, Hirokazu Ikeda, Masaki Fuyama, Rei Ogawa, Yoko Fujimoto

Department of Pediatrics, Showa University Fujigaoka Hospital

Abstract : Many bacteria inhabit the human intestine and form gut microbiota.

Recently, the relationship between changes in the gut microbiota and various diseases has been reported. This study aimed to investigate the distribution of the gut microbiota in children with lower urethral disorders and functional constipation. We searched for intestinal bacteria in 10 children with lower urethral disorders and functional constipation (8 boys, 2 girls, with an average age of 8.1 years) and 10 healthy children (10 boys, with an average age of 7.1 years). We cultured these intestinal bacteria and searched for four bacteria. Our results revealed that, *Clostridium* and *Lactobacillus* were significantly increased in children with lower urinary urethral disorders and functional constipation ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference in other bacterial species and total bacterial count. Changes in the gut microbiota may affect urination and

defecation. Probiotics may improve underlying disease and lower urinary tract abnormalities.

Key words: gut microbiota, lower urethral disorder, probiotics

表 1 患者背景

P 群				C 群			
	年齢	性別	基礎疾患		年齢	性別	基礎疾患
Case.1	14	M	機能性便秘症	Case.1	10	M	なし
Case.2	7	M	機能性便秘症、ADHD*	Case.2	12	M	なし
Case.3	10	M	機能性便秘症	Case.3	6	M	なし
Case.4	6	F	機能性便秘症	Case.4	6	M	なし
Case.5	8	M	機能性便秘症,ASD**	Case.5	6	M	なし
Case.6	8	M	機能性便秘症,ADHD*,てんかん	Case.6	4	M	なし
Case.7	6	F	機能性便秘症,ADHD*	Case.7	3	M	なし
Case.8	6	M	機能性便秘症,ASD**	Case.8	3	M	なし
Case.9	5	M	機能性便秘症	Case.9	10	M	なし
Case.10	11	M	機能性便秘症, てんかん	Case.10	12	M	なし
平均	8.1			平均	7.2		
SD	2.66			SD	3.34		

\*ADHD：注意欠陥多動性障害（attention deficit/hyperactivity disorder）

\*\*ASD：自閉症スペクトラム（autism spectrum disorder）

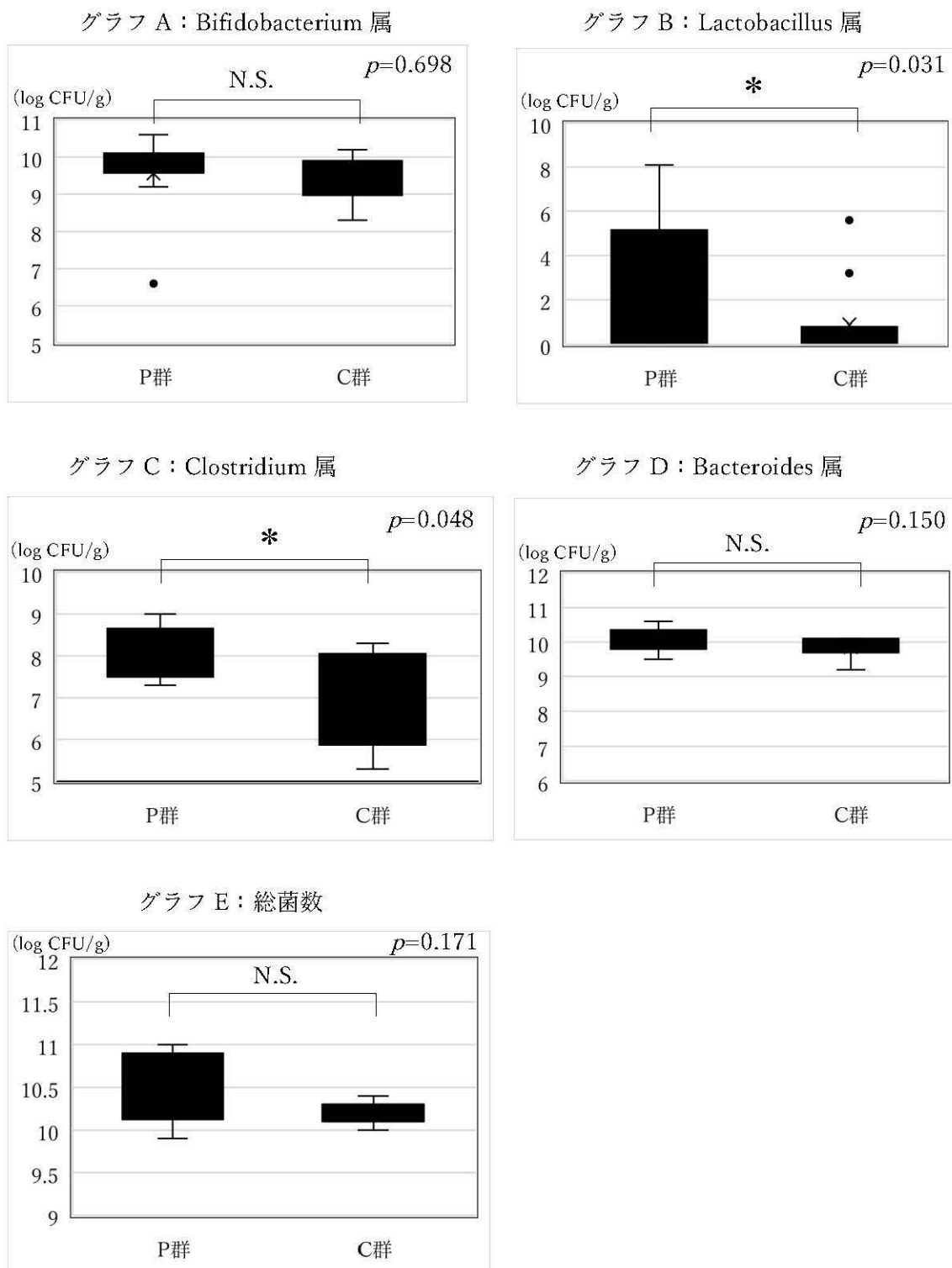
M：Male, F：Female

表 2 腸内細菌叢の解析結果（菌数の単位は log/CFU/g）

	<i>Bifidobacterium</i> 属		<i>Lactobacillus</i> 属		<i>Clostridium</i> 属		<i>Bacteroides</i> 属		総菌数	
	P 群	C 群	P 群	C 群	P 群	C 群	P 群	C 群	P 群	C 群
	9.9	10.2	8.3	5.6	7.3	5.3	9.5	9.8	10.2	10.3
	10.1	9.7	0.0	0.0	8.2	5.8	10.6	9.7	11.0	10.1
	9.8	9.2	6.1	0.0	8.0	8.2	10.3	10.1	10.9	10.3
	10.6	9.4	0.0	0.0	7.7	8.3	10.5	10.1	10.9	10.4
	9.7	9.3	4.2	0.0	9.0	7.8	9.9	10.0	10.3	10.3
	10.1	9.9	8.1	0.0	7.3	7.9	10.2	9.9	10.5	10.3
	9.7	8.3	3.1	0.0	8.0	8.0	9.9	10.1	10.2	10.3
	6.6	8.3	4.0	0.0	7.8	7.8	9.8	9.9	9.9	10.0
	9.2	9.8	0.0	3.9	8.3	6.7	9.8	9.2	9.9	10.1
	9.9	9.9	2.8	3.2	9.0	5.9	10.1	9.7	10.4	10.2
Ave.	9.56	9.4	3.66	1.27	8.06	7.17	10.06	9.85	10.42	10.23
SD	1.04	0.62	2.98	2.02	0.57	1.08	0.33	0.26	0.38	0.12
p 値	0.698		0.031*		0.048*		0.15		0.171	

\* $p < 0.05$

図 P群とC群における4菌種の数と総菌数の差



N.S. : not significant, \* :  $p < 0.05$



Figure legend : P 群と C 群における 4 菌種 (Bifidobacterium 属、Lactobacillus 属、Clostridium 属、Bacteroides 属) と総菌数を示す。図中で、有意差を認められたものを \* で、有意差を認めなかったものを N.S. (not significant) で表した。

Lactobacillus 属 (グラフ B) では C 群より P 群で有意に多く ( $p=0.031 < 0.05$ )、Clostridium 属 (グラフ C) でも C 群より P 群で有意に多かった ( $p=0.048 < 0.05$ )。Bifidobacterium 属 (グラフ A)、Bacteroides 属 (グラフ D)、および総菌数 (グラフ E) では 2 群間で有意差は認めなかった。