Human Developmental Research
2017.Vol.31，55-72

自閉症スペクトラムにおける偏食と醗酵乳食品摂取の認知・情動機能への影響

京都大学霊長類研究所　後　藤　幸　織
京都大学霊長類研究所　入　口　真夕子
京都大学大学院人間・環境学研究科　小　川　詩　乃
大邱カトリック大学食品栄養学科　李　　英　娥

The influence of biased nutrition and consumptions of fermented milk products on cognitive and affective functions in autism spectrum disorder

Kyoto University Primate Research Institute, GOTO, Yukiori
Kyoto University Primate Research Institute, IRIGUCHI, Mayuko
Graduate School of Human and Environmental Studies,
Kyoto University, OGAWA, Shino
Department of Food Science and Nutrition,
Catholic University of Daegu, LEE, Young-A

要　約

自閉症スペクトラム(ASD)は「対人的コミュニケーションと相互作用の障害」ならびに「限局された反復する行動や興味」を伴う脳機能発達障害の１つである。とりわけ，同一性へのこだわり，著しく限局された興味，感覚刺激の反応亢進または定反応といった症状から，ASD 児では，偏食が健常児よりも強いことが知られている。また，近年，腸内細菌が認知機能やその他の脳機能に強い影響を及ぼすことが見出され，話題となっている。したがって，ASD 児では，食物摂取の偏りによる腸内細菌叢は定型発達(TD)児のものと異なっており，また，そのような変化が認知機能や情動機能の障害に関わっている可能性が考えられる。本研究では，ASD 児を対象に，認知機能障害と偏食による腸内細菌叢の偏りとの関連性の調査を行った。その結果，ASD 児では特定の食べ物に固執するような偏食傾向が見られた。しかし，ASD 児と TD 児ともに，腸内細菌叢を操作するため，ビフィズス菌または乳酸菌を含む醗酵乳食品を１ヶ月間摂取してもらったが，認知機能や情動機能に顕著な影響は見られなかった。これらの結果は，少ない被験者数による実験から得られたものであり，今後，より大規模なサンプル数での確認が必要である。

【キー・ワード】自閉症スペクトラム，腸内細菌，認知機能，偏食

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder that involves deficits on social interaction with others and repetitive stereotyped behavior and interests. Because of such ASD symptoms as obsessiveness toward identity, restricted interests to others, and augmented sensitivity to sensory stimuli, children with ASD exhibit biased food preference, which may cause distinct compositions of gut microbiota than those of typically developing (TD) children. Recent studies have demonstrated substantial influences of gut microbiota on cognitive and affective functions of both animals and humans. Collectively, some aspects of cognitive and affective dysfunction suggested in ASD may be under influence of such altered gut microbiota. In this study, we investigated a potential relationship between altered gut microbiota associated with biased food consumptions and cognitive and affective dysfunction in ASD. We found that ASD children exhibited stronger biases on food preference than TD children. To manipulate gut microbiota, fermented milk products with *Bifidobacterium* or *Lactobacterium* have been administered semi-chronically for 1 month in both ASD and TD children. However, these manipulations did not have any effect on cognitive and affective functions in these children. Since the current study was conducted with a small sample number, repeating the experiments with a larger sample number is required to confirm the findings.

【Key words】　autism spectrum disorder, gut microbiota, cognitive function, biased nutrition

はじめに

自閉症スペクトラム障害(Autism spectrum disorder; ASD)は「対人的コミュニケーションと相互作用の障害」ならびに「限局された反復する行動や興味（こだわり）」を伴う発達障害の１つである(APA, 2014)。とりわけ，同一性へのこだわり，著しく限局された興味，感覚刺激の反応亢進または定反応といった症状から，ASD 児では，偏食が健常児よりも強いことが知られている(Mari-Bauset et al., 2014)。Hubbard らによると(Hubbard et a.l, 2014)，ASD 児では，定型発達(Typically developing; TD)児と比較して，歯ごたえ/堅さ，味/匂い，混合，ブランド名，形などにより強い拘りが見られ，温度，色，食べ物同士が接触していることに対しての拘りは健常児と同程度，と報告している。

ASD では多様な認知機能障害が見られることが報告されている(Hughes et al., 1994; Leung et al., 2015; Frith, 2012; Hill, 2004)。例えば，そのような認知機能障害の１つに作業記憶(ワーキングメモリ)があるが，この機能障害が認められるとする研究報告例(Bennetto et al., 1996)と認められないとする研究報告例(Russell et al., 1996)が混在しており，結論が一致していない。このような研究結果の不一致は，ASD の病理生理学的変化の多様性，認知機能検査手法の相違，被験者の年齢や性別など，様々な要因が寄与している可能性が考えられるが，それらに加えて，ASD に見られる認知機能

障害は，ASD に直接関連する一次的な病理生理学的変化によるものではなく，二次的要因によるものではないか，という説が提唱されている(Dawson et al., 1998; Dawson et al, 2002; Griffith et al., 1999; Yerys et al., 2007)。

近年，腸内細菌が認知機能やその他の脳機能に強い影響を及ぼすことが見出され，話題となっている(Mayer et al., 2014)。なかでも，ASD の動物モデルを用いた研究では，社会性行動と腸内細菌叢に関連があることが見出され(Hsiao et al., 2013)，ASD 症状と腸内細菌叢との密接な関係が示唆されている(Mayer et al., 2014; van De Sande et al., 2014)。また，ヒトにおいても，健常成人女性では，継続してプロバイオティクス食品(例えばヨーグルトや納豆などの腸内細菌叢に影響を与える醗酵食品など)を摂取することで，不安や負の情動反応とそれに関連する脳活動が抑制されることなどが見出されている(Tillisch et al., 2013)。

ASD 児の腸内細菌叢の変化を調査した研究がいくつかあり，それらによると，ASD 症状と腸内細菌叢の種類の多さに負の相関関係(腸内細菌の種類が少ないほど，ASD 症状が強い)があり(Kang et al., 2013)，また，偏性嫌気性桿菌の１つであるビフィズス菌(*Bifidobacterium*)が TD 児よりも有意に低下していることが見出されている(De Angelis et al., 2013; Adams et al., 2011)。

以上から，ASD 児での偏食による食物摂取の偏りには様々なものが考えられるが(例えば，ミネラル等も脳機能に必要不可欠な成分であるが)，なかでも，偏食による腸内細菌叢の変化が社会性認知機能の障害に関わっていることが考えられる。本研究では，自閉症スペクトラム(ASD)児での認知機能障害と偏食による腸内細菌叢の偏りとの関連性を調査することを目的として, 実験を行った。まず，ASD 児と TD 児を対象に，質問用紙を用いた偏食の調査を行い，認知・情動機能をテストする心理課題の成績との相関関係を調査した。また，ビフィズス菌または乳酸菌(*Lactobacterium*)を含む醗酵食品(ヨーグルト)を継続的に摂取してもらい，摂取前後で，認知・情動機能，ならびに摂取後に不安尺度を調査した。とりわけ，ASD 児では TD 児よりも偏食が強く，また，偏食と認知・情動機能との相関関係が見られること，さらに，ビフィズス菌が ASD 児で低下しているとの報告から(De Angelis et al., 2013; Adams et al., 2011)，ビフィズス菌を含む醗酵乳食品の継続摂取により，ASD 児においては，認知・情動機能の向上が見られることなどが期待された。

方　法

1. 被験者

京都大学こころの未来研究センター「発達障害の学習支援・コミュニケーション支援プロジェクト」で学習支援を受けている ASD 児 10 名(男児 8 名・女児 2 名，年齢:157.1±4.17 ヶ月[平均±標準誤差])ならびに TD 児 13 名(男児 3 名・女児 10 名，年齢:128.4±8.46 ヶ月)を対象に実験を行った。自閉症スペクトラム指数(Autism quotient; AQ; 若林 & 東條, 2004)，偏食に関する質問紙，ならびに Brief Autism Mealtime Behavior Inventory (BAMBI; Lukens & Linscheid, 2008)の書面調査を行った。BAMBI は，作成者である Lukens と Linscheid の許可を得て，日本語に翻訳したものを用いた(表 1)。偏食に関する質問紙は，Youth/Adolescent Food Frequency Questionnaire (FFQ; Rockett et

al., 1997)を参考に作成したものを使用した。また，情動機能として，不安尺度を調査するため，発酵乳食品摂取ならびに心理課題終了後， 日本語版の Spence Children's Anxiety Scale (SCAS; Spence, 1997; Ishikawa et al., 2009)の回答をしてもらった。

表 1　Brief Autism Mealtime Behavior Inventory 日本語版

過去 6 ヶ月間のあなたのお子さんの食事中の行動を考えてください。
1) 以下にある項目を，点数表をもとに評価してください。
2) そのような行動が問題であると考える場合 YES(Y)を，問題では無いと考える場合 NO(N)を選んでください。

例　「子どもは過去 6 ヶ月にそのような行動を全く起こしていないが，もしそのようなことを起こした場合，問題であると考える」場合には，(1)と(Y)を回答する	全く無い	ほとんど無い	たまにある	しばしばある	頻繁にある	問題である	問題ではない
1. 食事中に泣いたり，さけんだりする。	①	2	3	4	5	Ⓨ	N

	全く無い	ほとんど無い	たまにある	しばしばある	頻繁にある	問題である	問題ではない
1. 食事中に泣いたり，さけんだりする。	1	2	3	4	5	Y	N
2. 食べ物から顔をそむけたり，遠ざかったりする。	1	2	3	4	5	Y	N
3. 食事が終わるまで席についている。	1	2	3	4	5	Y	N
4. 食べているものを吐き出したりする。	1	2	3	4	5	Y	N
5. 食事中に攻撃的である(ものや人をたたいたり，蹴ったり，ひっかいたり，かんだりする)。	1	2	3	4	5	Y	N
6. 食事中に自分を傷つけたりする(自分自身をたたいたり，かんだりする)。	1	2	3	4	5	Y	N
7. 食事中に破壊行動をする(食器や食べ物を投げたり，押しつぶしたりする)。	1	2	3	4	5	Y	N
8. 食事が出されたときに，口を硬く閉じて食べようとしない。	1	2	3	4	5	Y	N
9. 食事するときは決まった食器を使わなければならないよう要求する。	1	2	3	4	5	Y	N
10. 食事の手順はまちまちである。	1	2	3	4	5	Y	N
11. 新しい食べ物を試そうとする。	1	2	3	4	5	Y	N
12. 食事中，食べ物で遊んだりする。	1	2	3	4	5	Y	N
13. ある特定の食べ物が嫌いで食べようとしない。	1	2	3	4	5	Y	N
14. たくさん噛まなければならない食べ物は食べようとしない(柔らかい食べ物を好む)。	1	2	3	4	5	Y	N
15. 毎食ごとに，同じ食べ物ばかり食べようとする。	1	2	3	4	5	Y	N
16. 「カリカリ」した食感の食べ物(例えばスナック菓子やクラッカーなど)を好む。	1	2	3	4	5	Y	N
17. 色々な食べ物を食べるのを好む(または受け入れる)。	1	2	3	4	5	Y	N
18. 炭水化物(米，パン，パスタ，じゃがいもなど)を好む。	1	2	3	4	5	Y	N
19. ある決まった盛り付け方をした食べ物を好む。	1	2	3	4	5	Y	N
20. 甘い食べ物(キャンディー，ケーキなど)ばかり好む。	1	2	3	4	5	Y	N
21. ある決まった料理方法(揚げ物，冷たい食べ物，生野菜など)で作られた食べものを好む。	1	2	3	4	5	Y	N

2. 醗酵乳食品の摂取

プロバイオティクス食品の継続摂取により腸内細菌叢を変化させることにより，認知機能に影響があるかを検証するため，被験者にビフィズス菌または乳酸菌入りのヨーグルトを継続して摂取してもらった。ビフィズス菌入りヨーグルトは，森永ビヒダス(*Bifidobacterium Longum* BB536 株)，乳酸菌入りヨーグルトは明治プロビオ LG21(*Lactobacillus Gasseri* OLL2716 株)を摂取してもらった。摂取量は，それぞれ 112 g/日とした。また，プラセボ効果を排除するため，被験者ならびにその保護者には食物摂取の予想される効果は事前に通知しなかった。摂取日数は 3 週間以上とし，平均摂取日数は ASD・ビフィズス菌群(ASD+Bf)が 28.0±2. 61 日，ASD・乳酸菌群(ASD+Lc)が 28.8±2. 62 日，TD・ビフィズス菌群(TD+Bf)が 28.6±2. 79 日，TD・乳酸菌群(TD＋Lc)が 30.8±2. 33 日であった。

3. 認知機能課題

認知機能を調査する課題として，ウィスコンシンカード分類テスト(Wisconsin Card Sorting Test; WCST)，ワーキングメモリテスト(WMT)，眼差し感情読み取りテスト(Reading the Mind in the Eyes Test; RMET)の計 3 つを，被験者ごとにランダムな順番で行ってもらった。

3. 1 WCST

行動柔軟性を調査する心理課題として WCST を用いた。WCST は，鹿島らによる慶應版(WCST-KFS)コンピュータバージョン(鹿島 & 加藤, 1995; 小林, 1999)を使用した。このテストでは，PC 画面の上部に 4 種類のカードが提示され，被験者は画面中央に示される 1 枚のカードを色，形，数のいずれかのルールに従い，その 4 種類のカードいずれかに合致するよう分類を行う。カードの色は赤，黄，緑，青の 4 色，形は三角，星型，十字，丸の 4 つ，数は 1～4 のいずれかで構成され，ランダムに現れる。被験者が予め設定されたルールと同じルールでカードを分類できるかどうかにより，正誤が画面上に示される。また，このルールは課題を進める途中で変わり，被験者は新しいルールを推測し回答することを求められる。このテストで見られたネルソン型の固執性誤り(Perseverative error, Nelson type)の回答率(%PEN)を行動柔軟性の指標として記録・解析した。

3. 2 WMT

ワーキングメモリテストは，我々が開発した，空間性(WMT-S)ならびに非空間性(WMT-NS)ワーキングメモリを同時に調査できる課題を用いた。このテストでは，12 種類の果物（かき，キウイ，パイナップル，もも，スイカ，りんご，みかん，さくらんぼ，いちご，ぶどう，バナナ，メロン）の絵を使用し，そのうち 3 種類の果物の絵が 9 マスの四角で区切られた PC 画面上のマスのいずれかに提示され，被験者はその果物の種類と提示された場所を記憶するよう求められる。画面は 1 秒間のみ表示され，その後 1 秒，5 秒，15 秒のいずれかの遅延時間の後に，新しい画面に変わる。そこでは先に表示された 3 つの果物のうち 1 つが別の種類の果物に変化しており，またもう 1 つの果物の場所が変わっている。被験者はどの果物が新しく現れたか，場所が変わったかを口頭で答える。課題を始める前に被験者に全ての果物の絵を見せ，その名前を口頭で答えてもらった。問題数は全部で 24 問あり，3 問の練習課題を実施した後に本番の課題を行った。遅延時間ごとの正答率を記録・解析した。

3. 3 RMET

社会性認知機能を調査するため，眼差し感情読み取りテスト(Baron-Cohen et al., 2001)を行った。このテストでは，被験者は PC 画面に提示された人物の眼差しの写真から，その感情を読み取る。写真は白黒であり，人物の両目のみが示され，その他の顔の部位は表示されない。眼差しの写真の下には，うれしい，かなしい，こわい，おこっている，おどろいている，いやがっているという感情を表す単語のうちいずれか 4 つの選択肢が設けられ，被験者はその選択肢から眼差しの写真に合致する 1 つを答える。問題はランダムな順番で提示され，合計 30 問となっている。それぞれの感情ごと，ならびに総合の正答率を記録・解析した。

4. データ解析

質問用紙を用いた偏食の調査結果と醗酵乳摂取前後の認知課題成績ならびに SCAS スコアとの相関関係を線形回帰解析を用いて検証した。発酵乳食品の継続摂取による RMET と WCST への影響は，三元配置反復測定分散分析(グループ[ASD vs. TD]，処置[Bf vs. Lc]，スコア[摂取前 vs. 摂取後])を用いて検証を行った。WM-NS ならびに WM-S への影響は，四元置反復測定分散分析(遅延時間[1 vs. 5 vs. 15 sec]，グループ[ASD vs. TD]，処置[Bf vs. Lc]，スコア[摂取前 vs. 摂取後])を用いて検証を行った。一方，SCAS では，二元分散分析(グループ[ASD vs. TD]，処置[Bf vs. Lc])による解析を行った。また，事後検定として，post-hoc Tukey テストを行い，それぞれの群の比較を行った。

結　果

1. ASD 児と TD 児での偏食

偏食に関する質問紙(図 1)ならびに BAMBI(図 2，表 1)による調査結果において，ASD 児と TD 児の間にいくつかの有意な差が見られた。

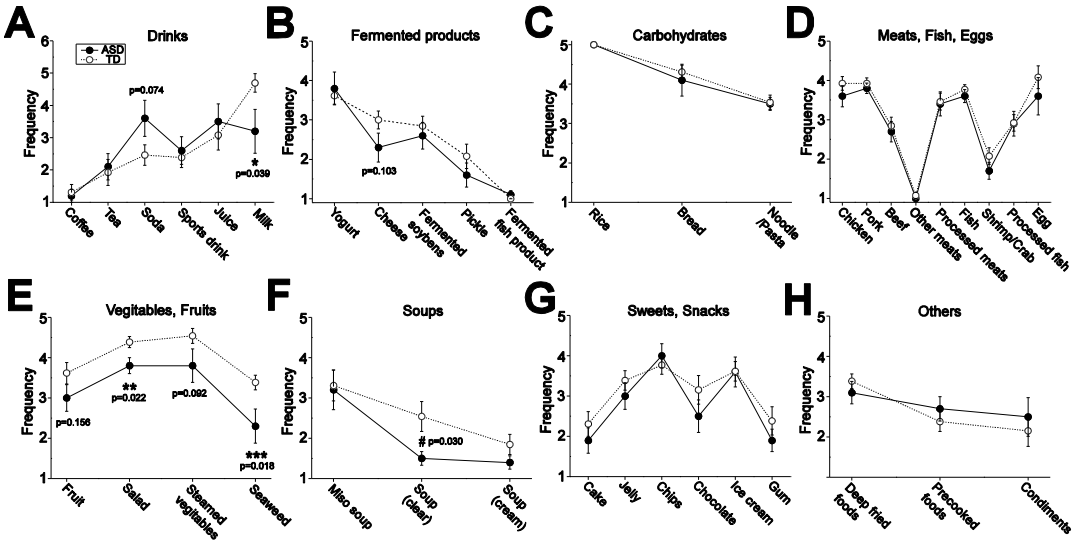

図 1　偏食に関する質問紙による ASD 児と TD 児の日常の食物摂取状況の調査結果

調査項目は大きく 8 つのカテゴリーに分けられる(A:飲み物，B:醗酵食品，C:炭水化物，D:肉・魚・卵等のタンパク質，E:野菜・果物，F:スープ，G:菓子，H:その他)。それぞれのグラフ Y 軸は，日常の摂取頻度を示す(高いほど，数値が大きくなる)。

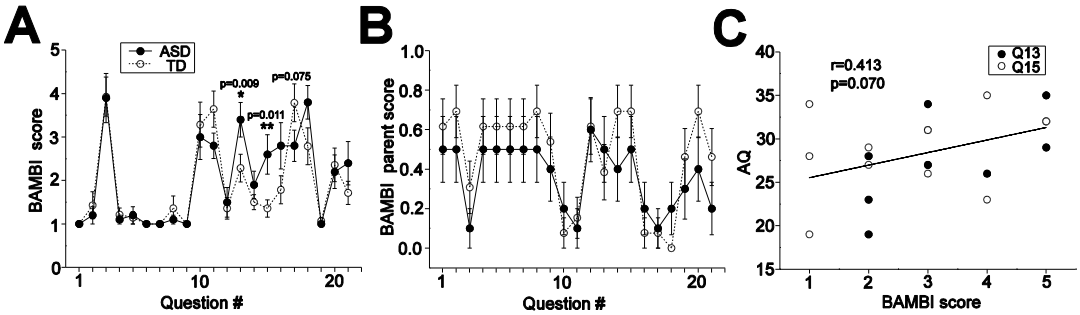

図 2　Brief Autism Mealtime Behavior Inventory (BAMBI)による
ASD 児と TD 児での食事問題調査の結果

(A) 質問項目ごとのスコアを示したグラフ。 (B) 被験者の保護者による質問項目ごとの問題視傾向を示したグラフ。Appendix 1 にある問題ありを 1，問題なしを 0 として計算。 (C) Q13 と Q15 でのスコアと ASD 児での AQ のスコアの相関関係を示したグラフ。

偏食に関する質問紙では，ASD 児において野菜類全般の摂取が TD 児よりも低い傾向が見られた(図 1E)。また，牛乳 (独立 t 検定, p=0.039; 図 1A)，スープ(透明タイプ; p=0.030; 図 1F)，サラダ(p=0.022; 図 1E)，海草(p=0.016; 図 1E)といった項目では統計的に有意な低下が見られたほか，統計的な有意差は見られなかったものの，ASD 児では，TD 児と比較して，チーズの摂取量は低く

(p=0.103; 図 1B)，炭酸飲料の摂取量は高い傾向が見られた(p=0.074; 図 1A)。

BAMBI では,「Q13:ある特定の食べ物が嫌いで食べようとしない」(p=0.009; 図 2A)ならびに「Q15: 毎食ごとに，同じ食べ物ばかり食べようとする」(p=0.011; 図 2A)の 2 つの項目で，ASD 児で TD 児よりも有意に高い数値(頻度が高い)が見られた。また，「Q17: 色々な食べ物を食べるのを好む（または受け入れる）」では逆に，ASD 児で TD 児よりも低い傾向(p=0.075; 図 2A)が見られた。したがって，ASD 児は TD 児と比較して，特定の食べ物に固執する傾向が強いことが見出された。一方，保護者の質問項目に対する問題視の傾向は ASD 児と TD 児との間で差は見られなかった(図 2B)ことから，このような ASD 児と TD 児との差は保護者による教育等にはよらないことが示唆される。

偏食と認知・情動機能との関連を調査するため，BAMBI で有意な差が見られた Q13 ならびに Q15 の ASD 児でのスコアと AQ，SCAS のスコア，ならびに 3 つの認知課題の成績との相関関係を線形回帰解析で検証した。その結果，統計的な有意差には達しなかったが，BAMBI のスコアと AQ との間で，正の相関関係の傾向が見られた(図 2C)。一方，BAMBI のスコアと SCAS のスコア，WCST の固執性誤りによる回答率，WMT-S・WMT-NS の正答率，ならびに RMET の正答率との間には相関関係は見られなかった。

以上の結果から，ASD 児は TD 児と比較して，偏食の傾向が強いこと，ならびにそのような偏食は自閉症の症状が強いほど強くなる傾向があること，またその一方，そのような ASD 児における偏食は，認知・情動機能との関連性はないことが示唆される。

2. 発酵乳食品継続摂取による認知・情動機能への影響

摂取途中で体調不良のため中止した被験者などを除き，最終的に，ASD+Bf 群と ASD+Lc 群それぞれ n=5 ずつ，TD+Bf 群 n=6，TD+Lc 群 n=5 で，発酵乳食品継続摂取前後での認知課題を行った。

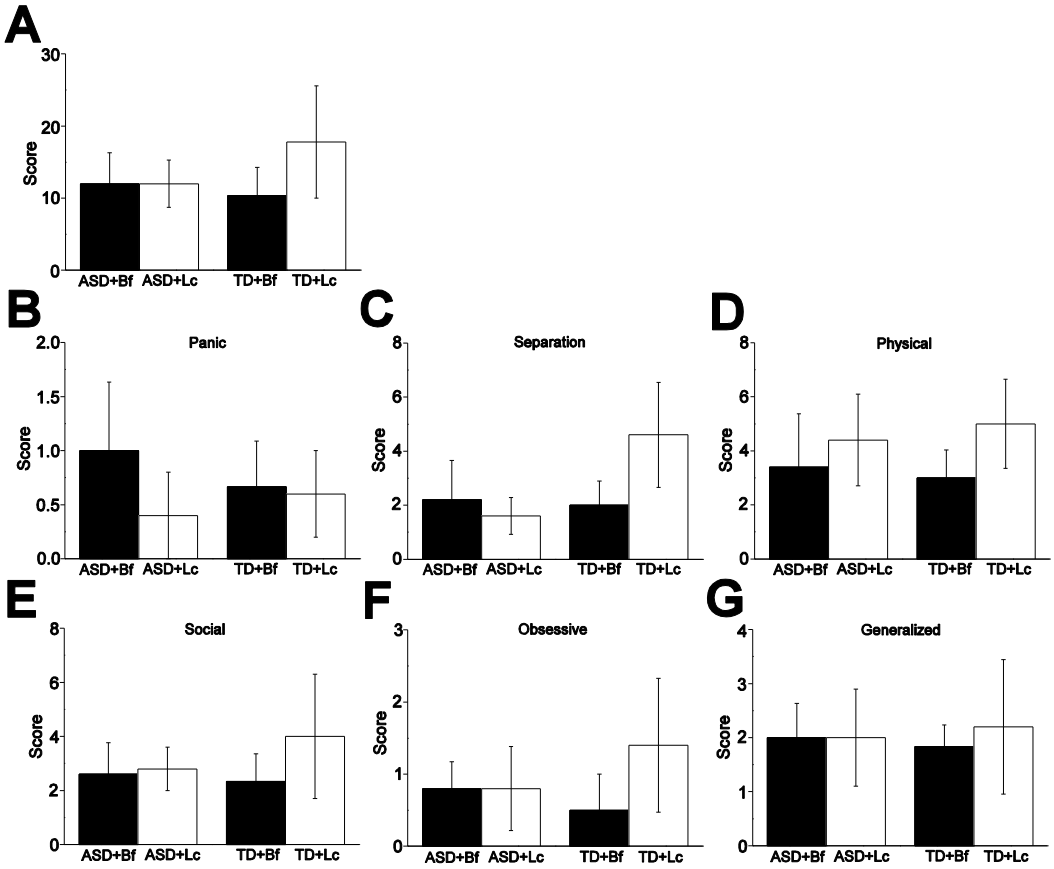

図 3　ASD 児と TD 児における発酵乳食品摂取後での
Spence Children's Anxiety Scale(SCAS)による不安調査の結果

(A) 総合スコアを示したグラフ。(B－G) それぞれの項目別のスコアを示したグラフ。

SCAS のスコアは各群の間に有意な差は見られなかった(図 3A)。また, SCAS の Panic, Separation, Physical, Obsessive, Social, ならびに Generalized anxiety のそれぞれの項目ごとに解析を行ったが, いずれの項目でも差は見られなかった(図 3B－G)。

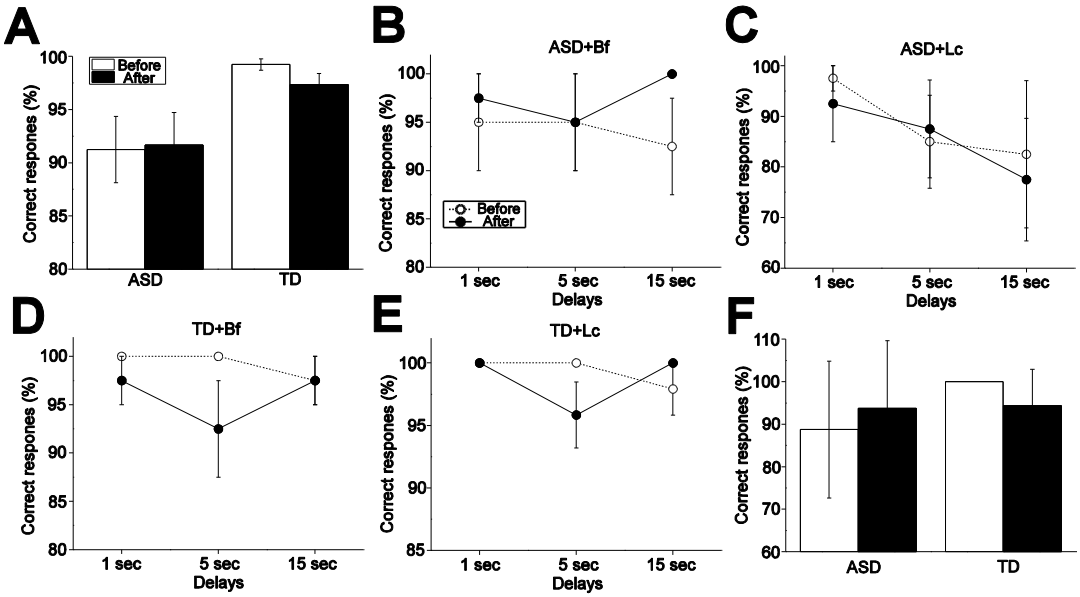

図 4　発酵乳食品摂取前後での非空間性ワーキングメモリ課題(WMT-NS)の成績結果

(A)　ASD 群と TD 群での処置(Bf, Lc)ならびに遅延時間をまとめて，発酵乳食品摂取前後の成績を示したグラフ。(B－E) ASD 群と TD 群での処置と遅延時間をそれぞれ分けて発酵乳食品摂取前後での成績を示したグラフ。 (F) ASD 群と TD 群での処置(Bf, Lc)をまとめて，15 秒の遅延時間条件において，発酵乳食品摂取前後での成績を示したグラフ。

WMT-NS においては，ASD 群と TD 群との間に統計的に有意な成績の差が確認された($F_{1,51}$=5.68, p=0.021; 図 4A)。また，グループ x 処置の相互作用($F_{1,51}$=3.23, p=0.078)，スコア x グループ x 処置の相互作用($F_{1,51}$=2.92, p=0.093)，ならびにスコア x グループ x 遅延時間の相互作用($F_{2,51}$=2.89, p=0.065)に統計的有意には達しなかったものの，異なる傾向が見られた。しかし，事後検定においては，Bf と Lc それぞれの発酵乳食品継続摂取前後での変化は ASD，TD 群ともに見られなかった(図 4B－E)。異なる遅延時間ごとに再度，分散分析を行った結果，遅延時間 15 秒の条件において，スコア x グループの相互作用に有意な差が見られた($F_{1,17}$=6.33, p=0.022)。このことは，図 4F に示されているように，発酵乳食品の種類を考慮しなかった場合において，発酵乳食品摂取前に ASD 群でわずかではあるが低かった成績が摂取後に TD 群と同じ水準の成績程度の上昇が見られたことによるものである。WMT-S においても同様に，ASD 群と TD 群との間に統計的に有意な成績の差が確認された($F_{1,51}$=7.57, p=0.008; 図 5A)。また，処置 ($F_{1,51}$=3.80, p=0.057)ならびにグループ x 処置の相互作用($F_{1,51}$=3.35, p=0.073)に統計的有意には達しなかったものの，異なる傾向が見られた。しかし，事後検定においては，Bf と Lc それぞれの発酵乳食品継続摂取前後での変化は ASD，TD 群ともに見られなかった(図 5B－E)。

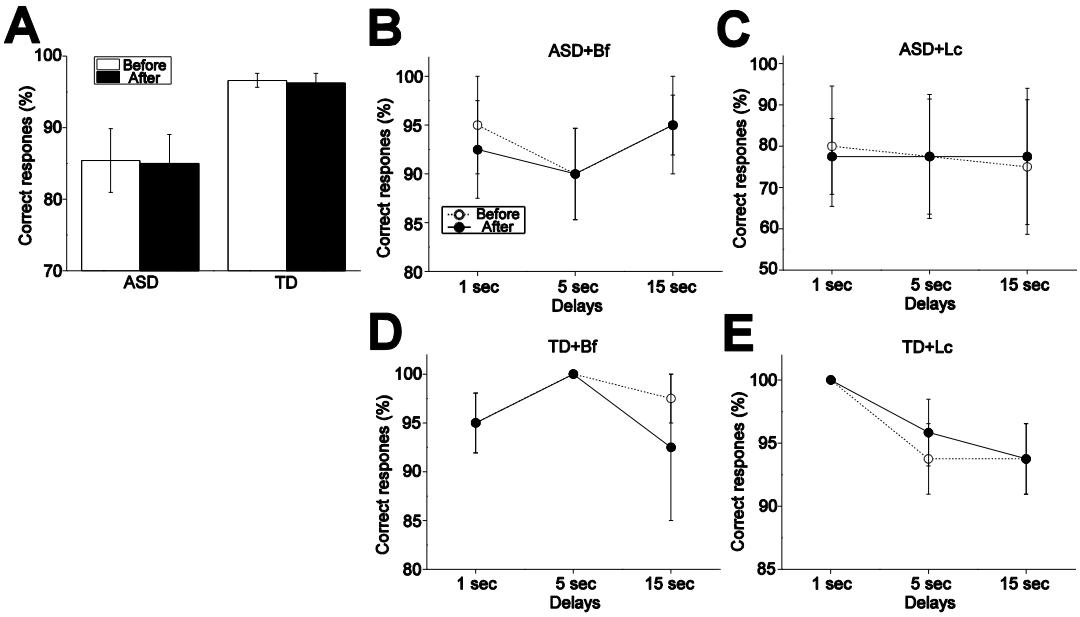

図 5　発酵乳食品摂取前後での空間性ワーキングメモリ課題(WMT-S)の成績結果

(A)　ASD 群と TD 群での処置(Bf, Lc)ならびに遅延時間をまとめて，発酵乳食品摂取前後の成績を示したグラフ。(B－E) ASD 群と TD 群での処置と遅延時間をそれぞれ分けて発酵乳食品摂取前後での成績を示したグラフ。

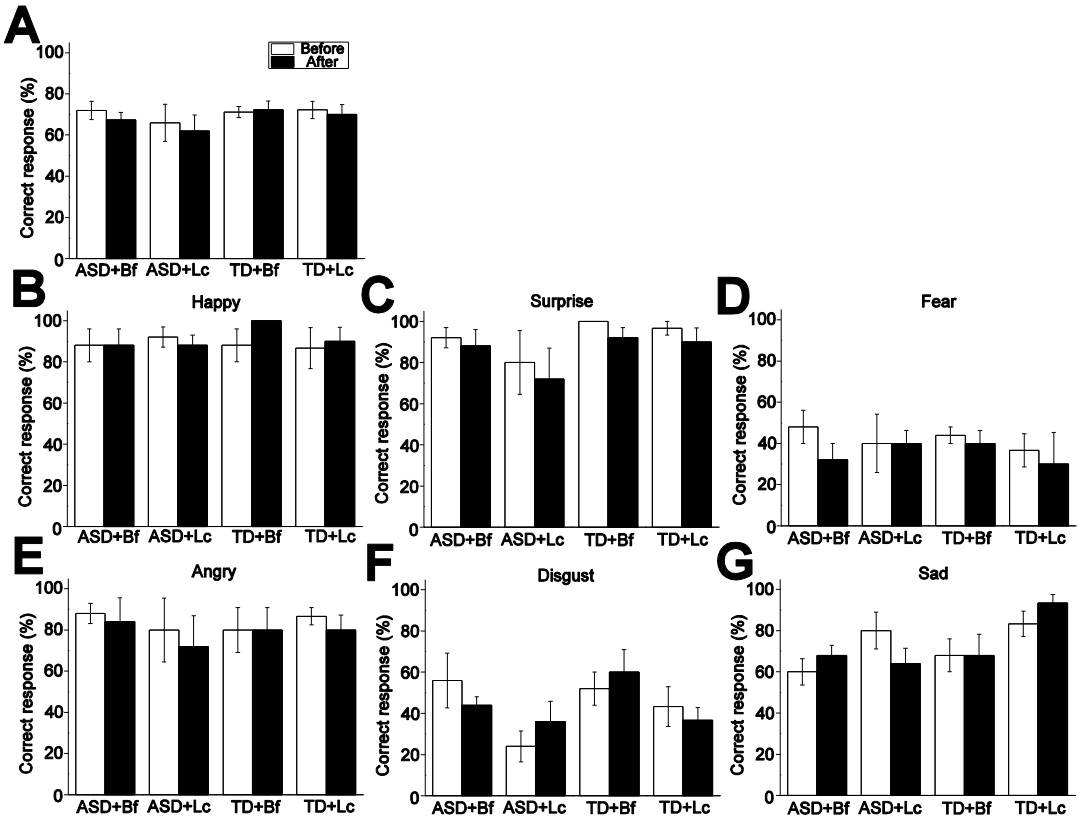

図 6　発酵乳食品摂取前後での眼差し感情読み取り課題(RMET)の成績結果

(A) 総合正答率を示したグラフ。(B－G) それぞれの感情項目別(B:うれしい, C:おどろいている, D:こわい, E:おこっている, F:いやがっている, G:かなしい)の正答率を示したグラフ。

RMET では, ASD, TD 群ともに発酵乳食品摂取前後で変化は確認できなかった(図 6A)。同様に, RMET におけるそれぞれの感情ごとの比較においても, ASD, TD 群ともに発酵乳食品摂取前後で変化はなかった(図 6B－G)。

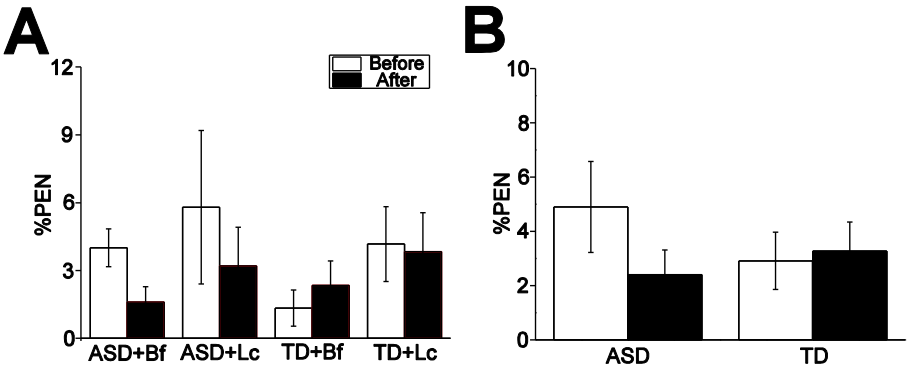

図 7　発酵乳食品摂取前後でのウィスコンシンカード分類課題(WCST)の成績結果

(A) 各群における，発酵乳食品摂取前後でのネルソン型固執性誤り反応率(%PEN; percentage of perseverative errors, Nelson type)を示したグラフ。 (B) ASD 群と TD 群での処置(Bf, Lc)をまとめて，発酵乳食品摂取後での固執性誤り反応率を示したグラフ。

WCST でのネルソン型の固執性誤り反応率においては，発酵乳食品継続摂取前後での変化は ASD, TD 群ともに見られなかった(図 7A)。しかし，統計的有意な差ではないものの，ASD 群と TD 群との間で，発酵乳食品の種類には依存せずに，摂取前後で異なる傾向が見られる(スコア x グループ, $F_{1,17}$=3.43, p=0.081)。このことは，図 7B に示されているように，ASD 群では，発酵乳食品摂取前には比較的高い固執性誤り反応率が，Bf, Lc の区別なく発酵乳食品摂取後に低下する傾向にある一方，TD 群では，固執性誤り反応率は摂取前でも比較的低く，摂取前後で変化がほとんど見られないことによるものである。

これらの結果から，ビフィズス菌ならびに乳酸菌の継続摂取による認知・情動機能への影響はほぼ無いことが示唆される。

考　察

本研究では，ASD 児と TD 児での偏食ならびに，発酵乳食品の継続摂取による認知・情動機能への影響を調査した。先行研究(Mari-Bauset et al., 2014; Hubbard et a.l, 2014)で報告されているように，ASD 児では TD 児よりも強い偏食傾向が確認された。とりわけ，本研究では，ASD 児は TD 児よりもより強く特定の食物に固執する傾向が見出された。また，ASD 児は，日常の食事において，主に野菜類などの特定の食物を TD 児よりも食べない傾向が見られた。一方，継続した醗酵乳食品摂取，とりわけ，ビフィズス菌や乳酸菌を含む食物による認知・情動機能への顕著な影響は，先行研究では，ヒト健常女性(Tillisch et al., 2013)やげっ歯類などの動物モデル(Bravo et al., 2011; Bercik et al., 2010)では報告されているが，本研究では，ASD 児，TD 児ともにそのような影響は確認できなかった。このような予想と反する結果となった理由として，以下のようなものが考えられる。

まず，もっとも大きな要因として，サンプル数がある。本研究は，途中で参加を中止した被験者を

除き，ASD 児 10 名，TD 児 11 名が参加した。またヨーグルトの種類ごとでは，ビフィズス菌入りヨーグルトが 11 名，乳酸菌入りヨーグルトが 10 名となっており，各被験者群とも極めて限られた人数での調査となった。そのため，被験者の偏食と発酵乳食品の摂取の，認知機能や情動機能への大きな影響は認められなかった。しかし，今後サンプル数を増やすことにより，自閉症スペクトラム児の偏食と腸内細菌叢，認知機能や情動機能の関連性と影響をより明確にできるものと期待する。

次に，発酵乳食品の摂取期間の問題が挙げられる。とりわけ，先行研究では，ASD 児での腸内細菌叢では，TD 児と比較して，種類が少ない(Kang et al., 2013)，また，ビフィズス菌が低下している(De Angelis et al., 2013; Adams et al., 2011)などの報告があることから，乳酸菌やビフィズス菌を含む発酵乳食品による効果が期待されていた。今回の研究におけるヨーグルトの摂取期間は 4 週間程度であり，腸内細菌叢による被験者の認知機能と情動機能への変化を観察するには期間が短いと言える。したがって，長期的にヨーグルトの摂取をしてもらい，その上で認知・情動機能への影響を検討する必要があるだろう。認知・情動機能に対する影響が得られるようになるには，少なくとも偏性嫌気性桿菌を含む腸内細菌叢の定常的な変化を得る必要がある。より長期的な発酵乳食品の摂取による腸内細菌への効果があるかどうかは，本研究では，予定していたが行うことが出来なかった定量的 PCR 法などを用いた被験者の腸内細菌叢の直接的な調査が必要であり，今後の課題である。

さらに，今回の研究結果に影響を及ぼしている要因として，被験者の普段からの発酵乳食品の摂取状態が考えられる。偏食に関する質問紙によると，本研究に参加した ASD 児，TD 児ともに，日常的にヨーグルトを摂取していた。したがって，元々頻繁にヨーグルトを摂取していた被験者の場合では，本研究で指定された期間のヨーグルトを摂取しても，認知機能や情動機能への大きな変化は見られなかったのではないかと考えられる。通常ヨーグルトを摂取していない被験者を対象に同様の調査を行い，認知機能と情動機能への影響を調べる必要がある。

また，今回の研究では，発酵乳食品摂取以前の状態においても，ASD 児と TD 児における認知課題の成績があまり明確でなかった。WMT-NS ならびに WMT-S においては，課題成績に ASD 児と TD 児との間の有意な差が見られたが，これは遅延時間を考慮しない場合においてのみであり，したがってワーキングメモリ以外の問題が考えられる。WCST においても，固執性誤り反応率が ASD 児において TD 児よりも高い傾向が見られたが，統計的に有意な差とはならなかった。また，今回用いた認知課題は，以前，我々が用いて行った研究で使用したものと同様のものであり，RMET において，ASD 児の成績は TD 児よりも低いことを見出しているが(Ogawa et al., manuscript in submission)，今回はそのような傾向は見られなかった。この主要な原因として，やはり被験者数の少なさがあると考えられる。また，それぞれの認知課題においても成績が全体的に高い傾向にあり，天井効果(Ceiling effect)による問題が考えられることから，より明確な効果を判定するには，今後はより難易度の高い心理課題を用いる必要がある。

現在までに，ASD での認知機能障害は多数報告されている。しかし，これらの研究報告では，結果に再現性がないことが指摘されている。その原因の 1 つに，ASD での認知機能障害は一次的な病理生理学的要因よりも，二次的要因が関与している可能性が示唆されている。しかし，そのような二次的要因が関わっている可能性を調査した研究は，我々が知る限りでは存在しなかった。このような国

内外の研究状況において，我々は，先行研究において，ASD 児に見られる空間ワーキングメモリの障害が慢性ストレスと強い相関関係があることから，ASD に見られる認知機能障害の一部は，ストレス等の二次的環境要因によるところが大きいことを見出した(Ogawa et al., manuscript in submission)。ストレスと同様，腸内細菌という二次的要因が ASD で示唆されている脳機能不全に影響を及ぼしていることが考えられる。とりわけ，脳機能と腸内細菌との関連の研究は，ここ数年で急激に増加し，脚光を浴びている研究領域である。このように，ASD に見られる認知機能障害の二次的要因を解明することにより，従来の研究結果に新しい知見をもたらすことが期待される。本研究では，ASD での認知機能障害に影響を及ぼす，ストレス以外の二次的要因として，偏食とそれによる腸内細菌叢の偏りとの関連性を調査した。本研究ではサンプル数の少なさなどの要因により，明確な結果を得ることが出来ず，今後の大規模な研究が待たれる。

引用文献

Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA (2011) Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* 11, 22.

American Psychiatric Association (2014) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.). Washington, DC.

Baron-Cohen S, Wheelwright S, Hill J, Raste Y, Plumb I (2001) The "Reading the Mind in the Eyes" Test revised version: a study with normal adults, and adults with Asperger syndrome or high-functioning autism. J Child Psychol Psychiatry. 2001 Feb;42(2):241-51

Bennetto L, Pennington BF, Rogers SJ (1996) Intact and impaired memory functions in autism. *Child Dev.* 67, 1816-35.

Bercik P1, Verdu EF, Foster JA, Macri J, Potter M, Huang X, Malinowski P, Jackson W, Blennerhassett P, Neufeld KA, Lu J, Khan WI, Corthesy-Theulaz I, Cherbut C, Bergonzelli GE, Collins SM (2010) Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology.* 139, 2102-12.

Bravo JA1, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF (2011) Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 16050-5.

Dawson G, Meltzoff AN, Osterling J, Rinaldi J (1998) Neuropsychological correlates of early symptoms of autism. *Child Dev.* 69, 1276-85.

Dawson G, Munson J, Estes A, Osterling J, McPartland J, Toth K, Carver L, Abbott R (2002) Neurocognitive function and joint attention ability in young children with autism spectrum disorder versus developmental delay. *Child Dev.* 73, 345-58.

De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazzanetti DI, Cristofori F,

Guerzoni ME, Gobbetti M, Francavilla R (2013) Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One.* 8, e76993.

Frith U (2012) Why we need cognitive explanations of autism. *Q J Exp Psychol (Hove).* 65, 2073-92.

Griffith EM, Pennington BF, Wehner EA, Rogers SJ (1999) Executive functions in young children with autism. *Child Dev.* 70, 817-32.

Harris C1, Card B (2012) A pilot study to evaluate nutritional influences on gastrointestinal symptoms and behavior patterns in children with Autism Spectrum Disorder. *Complement Ther Med.* 20, 437-40.

Hill EL (2004) Executive dysfunction in autism. *Trends Cogn Sci.* 8, 26-32.

Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK (2013) Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.* 155, 1451-63.

Hubbard KL, Anderson SE, Curtin C, Must A, Bandini LG (2014) A comparison of food refusal related to characteristics of food in children with autism spectrum disorder and typically developing children. *J Acad Nutr Diet.* 114, 1981-7.

Hughes C1, Russell J, Robbins TW (1994) Evidence for executive dysfunction in autism. *Neuropsychologia.* 32, 477-92.

Ishikawa S, Sato H, Sasagawa S (2009) Anxiety disorder symptoms in Japanese children and adolescents. *J Anxiety Disord.* 23, 104-11.

Kang DW1, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R (2013) Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One.* 8, e68322.

鹿島晴雄, 加藤元一郎(1995) Wisconsin card sorting test (Keio version)(KWCST). *脳と精神の医学.* 6, 209-16.

小林祥泰 (1999) Wisconsin card sorting test パソコン版(WCST-KFS version). 脳卒中データバンク. (http://cvddb.med.shimane-u.ac.jp/cvddb/user/wisconsin.htm).

Leung RC1, Vogan VM, Powell TL, Anagnostou E, Taylor MJ (2015) The role of executive functions in social impairment in Autism Spectrum Disorder. *Child Neuropsychol.* 3, 1-9.

Lukens CT1, Linscheid TR (2008) Development and validation of an inventory to assess mealtime behavior problems in children with autism. *J Autism Dev Disord.* 38, 342-52.

Marí-Bauset S, Zazpe I, Mari-Sanchis A, Llopis-González A, Morales-Suárez-Varela M (2014) Food selectivity in autism spectrum disorders: a systematic review. *J Child Neurol.* 29, 1554-61.

Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K (2014) Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci.* 34, 15490-6.

Mayer EA1, Padua D, Tillisch K (2014) Altered brain-gut axis in autism: comorbidity or causative mechanisms? *Bioessays.* 36, 933-9.

Rockett HR1, Breitenbach M, Frazier AL, Witschi J, Wolf AM, Field AE, Colditz GA (1997) Validation of a youth/adolescent food frequency questionnaire. *Prev Med.* 26, 808-16.

Russell J, Jarrold C, Henry L (1996) Working memory in children with autism and with moderate learning difficulties. *J Child Psychol Psychiatry.* 37, 673-86.

Spence SH (1997) Structure of anxiety symptoms among children: A confirmatory factor-analytic study. *J Abnorm Psychol.* 106, 280-97.

Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, Guyonnet D, Legrain-Raspaud S, Trotin B, Naliboff B, Mayer EA (2013) Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology.* 144, 1394-401.

van De Sande MM, van Buul VJ, Brouns FJ (2014) Autism and nutrition: the role of the gut-brain axis. *Nutr Res Rev.* 27, 199-214.

若林明雄，東條吉邦 (2004) 児童用 AQ(日本語版)の作成と標準化について．*国立特殊教育総合研究所分室平成 15 年度一般研究報告書，自閉性障害のある児童生徒の教育に関する研究.* 7，35-48.

Yerys BE1, Hepburn SL, Pennington BF, Rogers SJ (2007) Executive function in preschoolers with autism: evidence consistent with a secondary deficit. *J Autism Dev Disord.* 37, 1068-79.

謝　辞

本研究は，京都大学こころの未来研究センター「発達障害の学習支援・プロジェクト支援」（代表：吉川左紀子）の枠組みで行われました。吉川左紀子教授をはじめとする京都大学こころの未来研究センター関係者の皆さま，ならびに研究に協力してくださったお子様および保護者様に感謝いたします。