



Title	自閉スペクトラム症患者における口腔内および腸内細菌叢解析〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	飯田, 愛理
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15932号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92480
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Airi_Iida_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 飯 田 愛 理

学 位 論 文 題 名

自閉スペクトラム症患者における口腔内および腸内細菌叢解析

キーワード（5つ） 自閉スペクトラム症，腸，口腔，細菌叢，16SrRNA 遺伝子解析

近年、腸内細菌叢の構成異常が全身性の免疫異常や中枢神経系の炎症を引き起こし、脳機能に影響を与えることが明らかになり、様々な疾患との関係が注目されている。自閉スペクトラム症（ASD）は、その病因が明らかになっておらず、遺伝的要因に加え、環境的要因が関与していることが推測される。ASD 患者における特徴的な身体症状の一つとして胃腸障害が挙げられ、ASD 患者に抗菌薬を処方した結果、コミュニケーションの障害、反復的な行動等を特徴とする自閉的症状と消化器症状の双方が改善し、投与中止後にいずれの症状も再燃したという興味深い報告もあり、腸内細菌叢の異常が ASD の発症や、症状の悪化に関与する可能性が示唆されている。日々、唾液を飲み込むことで持続的に嚥下される口腔細菌は、直接的に、あるいは腸内細菌への影響を介して間接的に ASD に関与している可能性があるが、その詳細には未だ不明な点が多い。今回、ASD 患者から得た唾液と糞便から、口腔内と腸内の細菌叢を解析し、細菌叢の差異の有無について検討を行った。

ASD 患者 10 名と健常患者 10 名の計 20 名を対象とし、平均年齢は、ASD 群が 8 歳（5～19 歳）、健常群が 10 歳（3～14 歳）であり、男女比は両群とも一致していた（男：女＝8：2）。ASD 患者は、小児科や精神科等の医療機関において診断を受けている者とした。尚、抗菌薬を服用している者、既知の遺伝的疾患、臨床的に重篤な感染症又は炎症性疾患の既往のある者、重度齲蝕症や矯正治療中の者は研究対象者から除外した。唾液検体は、採取 30 分前から飲食や歯磨き、うがい薬の使用を控えるよう指示し、吐出法により安静時唾液を約 1mL 採取した。採取した検体は 15,000×g で 10 分間遠心分離し、沈査と上清に分離後、沈査を直ちに－78℃で冷凍保管した。糞便検体は、来院予定日の 1 週間前～当日までに、採便キットを用いて、対象者自身、あるいは保護者により採取した。採取後は常温で保存し、採便キット内の保存液 1mL を－78℃で冷凍保管した。収集された唾液・糞便検体より DNA を抽出し、プライマーを用いて解析対象領域（16SrRNA V3-V4）を増幅した。次世代シーケンサーである MiSeq（Illumina 社）を用いて塩基配列を解析し、得られた塩基配列には、シーケンサーエラーや PCR の増幅エラーの修正、除去を行った。解析は、Illumina 標準プロトコルに従って実行された。塩基配列情報は、Qiime2（v.2021.4）を用いて処理・解析を行い、各検体における細菌構成について明らかにした。本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て実施された（2019 年 5 月 14 日，自 018-0150）。

全体として、ASD 患者と健常者の口腔内および腸内細菌叢の構成に明らかな差異を認めた。菌組成解析の結果、ASD 患者の口腔内細菌叢は、健常者のそれと比較して、*Proteobacteria* 門や *Fusobacteria* 門の相対占有率が高値であり、*Actinobacteria* 門の占有率が低値であった。また、腸内細菌叢では、ASD 患者における *Firmicutes* 門や *Bacteroidetes* 門の占有率が高値であった。網レベルの各細菌の占有率で

は、ASD 患者の腸内細菌叢における *Clostridia* の存在量の増加が認められた。また、細菌叢の多様性解析において、ASD 患者と健常者の口腔内および腸内細菌叢を Weighted-Unifrac 距離でクラスタリングし、主座標分析によりプロットした結果、両者はそれぞれ一定の範囲内に偏って分布していた。口腔内および腸内細菌叢の双方において、検体間の類似性を表す β 多様性に有意な差異を認めた。LEfSe 解析では、ASD 群に特徴的な OTU (Operational Taxonomic Units : 分類学的操作単位) として、口腔細菌では、*Neisseria*、*Porphyromonas pasteri*、*Streptococcus* など、腸内細菌では、*Faecalibacterium*、*Bacteroides dorei*、*Prevotella copri* などが抽出された。

以上のことから、本研究より ASD 患者は口腔内および腸内細菌叢において、特徴的な細菌叢構成を有する可能性が示唆された。ASD 患者の両細菌叢において、特定の細菌 (門、綱) の相対占有率の変化が明らかになった。ASD 患者と健常者の細菌叢を比較した研究報告では、両者の細菌叢は異なるという方向で一致しているものの、違いの見られる細菌種等細部においては一貫していない。ASD 患者の細菌叢に変化を認めた要因として、偏食やこだわりの強さによる食生活の変化、消化器症状や口腔清掃状態の違いによる影響などが考えられるが、細菌叢の特異性と ASD との関連を明らかにするためには、さらなる検証が必要である。本研究において ASD 患者で最も特徴的な OTU として、腸内細菌叢では *Faecalibacterium* が検出された。本菌は、腸内細菌叢中の占有率の高値が、ASD 患者における腸管の膜透過性の亢進を支持し、腸管に炎症を誘導するといわれている。また、ASD 患者の口腔内細菌叢では、*Porphyromonas pasteri* が特徴的な OTU であった。*Porphyromonas* 属はリポ多糖等の宿主の免疫恒常性に影響を与える病原性因子を放出し、脳血管疾患に寄与することが報告されており、これらの細菌の発現差と ASD に相関がある可能性が示唆された。細菌叢は、宿主の環境因子に大きな影響を受けるため、国や文化の違いによりその表現型が大きく異なる可能性がある。本邦の ASD 患者における細菌叢の特異性を明らかにし、ASD の発症や行動特性との相互作用を解明することで、自閉的特徴の発生に先行した診断が可能となり、ASD 患者に重要とされる早期介入や早期療育の構築につながる可能性が示唆された。