



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 飯 田 愛 理

主査 教授 長谷部 晃
審査担当者 副査 教授 八若 保孝
副査 教授 北川 善政

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

審査は、審査担当者全員の出席の下、公聴会形式で実施された。はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者ならびに公聴会参加者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下に論文内容と審査の要旨を述べる。

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ことから、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 名を対象とした。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、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。綱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はそれぞれ一定の範囲内に偏って分布しており、さらにβ多様性にも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これまでの研究報告と本研究では、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、違いの見え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。本研究は、本邦の ASD 患者における細菌叢の特異性を明らかにすることで、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。

引き続き、上記の論文内容及び関連事項について、審査担当者から以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

1. ASD の病態や特徴的症状について。
2. 口腔内細菌と腸内細菌の相互作用について。
3. 国や人種、食事の違いが細菌叢に与える影響について。
4. 多様性解析の結果に関するグラフの読み方について。
5. ASD に特徴的な細菌において、門や綱、種レベルでの発現差の違いに相関があるかについて。
6. ASD の細菌叢解析に関し、先行研究をふまえた考察について。
7. ASD 以外の疾患で小児や障がい者を対象に常在菌叢を調べることの有意性について。

以上の質問に対して申請者から適切な回答および説明が得られた。審査担当者との質疑応答を通して、申請者が本研究ならびに関連分野を理解し、研究の立案と遂行ならびに結果の収集とその評価について、十分な能力を有していることを確認した。

本研究の業績は、ASD 患者が特異的な口腔内および腸内細菌叢構成を有する可能性を示唆し、ASD の発症や特徴的症状との関連を明らかにしていくことで、ASD 児の早期診断・療育につながる今後の研究に貢献することが期待された。したがって審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに相応しいと認めた。