



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	飯田, 愛理
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 http://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/94529
Type	doctoral thesis
File Information	Airi_Iida_summary.pdf



学位論文内容の要約

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

博士の専攻分野名称 博士（歯学） 氏名 飯田 愛理

【結言】

近年、腸内細菌叢の構成異常（dysbiosis）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[1]、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、その病因に未だ不明な点が多く、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[2]、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 患者の唾液と糞便から、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。

【方法】

ASD 患者と健常対照者を対象とし、平均年齢は ASD 群が 8 歳、健常群が 10 歳で、男女比は両群とも一致していた。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また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採取した。採取した検体は遠心分離し、沈査と上清に分離後、沈査を直ちに冷凍保管した。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を冷凍保管した。

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を増幅した。次世代シーケンサー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。塩基配列情報を処理・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。

【結果】

全体として、ASD 患者と健常対照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、*Clostridia* が ASD 患者の腸内細菌叢において高値であった。

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。

また、両群に差異のある細菌を抽出するため、各 OTU（分類学的操作単位, Operational Taxonomy Units）の検出リード数に基づいて、LEfSe(Linear discriminant analysis of effective size)解析を行った。LDA スコアが高値であり、両群の識別に有用な OTU として、口腔細菌では、*Neisseria*、*Porphyromonas pasteri*、*Streptococcus* 等、腸内細菌では、*Faecalibacterium*、*Bacteroides dorei*、*Prevotella copri* 等が抽出された。

【考察】

本研究より、ASD 患者は口腔内および腸内細菌叢において、細菌叢の特徴的な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[3–5]。ASD 患者の細菌叢に差異を

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等が考えられるが、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。

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。本菌においては、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[6]。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 LPS 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[7]、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。

【研究資金】

本研究は JSPS 科研費 20K18798 の助成を受けたものである。

【利益相反】

本研究において利益相反状態はない。

【文献】

- [1] De Theije CGM, Wu J, Da Silva SL, Kamphuis PJ, Garssen J, Korte SM, et al. Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. Eur J Pharmacol, vol. 668, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.013>.
- [2] Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, al e. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. J Child Neurol 2000;15:429–35.
- [3] Rosenfeld CS. Special section on drug metabolism and the microbiome - Perspective microbiome disturbances and autism spectrum disorders. Drug Metabolism and Disposition 2015;43:1557–71. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.063826>.
- [4] Kong X, Liu J, Cetinbas M, Sadreyev R, Koh M, Huang H, et al. New and preliminary evidence on altered oral and gut microbiota in individuals with autism spectrum disorder (ASD): Implications for ASD diagnosis and subtyping based on microbial biomarkers. Nutrients 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11092128>.
- [5] Olsen I, Hicks SD. Oral microbiota and autism spectrum disorder (ASD). J Oral Microbiol 2020;12. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1702806>.
- [6] Inoue R, Sakaue Y, Sawai C, Sawai T, Ozeki M, Romero-Pérez GA, et al. A preliminary investigation on the relationship between gut microbiota and gene expressions in peripheral mononuclear cells of infants with autism spectrum disorders. Biosci Biotechnol Biochem 2016;80:2450–8. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1222267>.
- [7] Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K, et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. PLoS One 2018;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>.