

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10157

研究課題名（和文）母親と新生児のメタゲノム解析を用いた健全な消化管細菌叢形成のための歯周治療戦略

研究課題名（英文）Metagenomic analysis of mothers and newborns to determine periodontal treatment strategies for the development of healthy gastrointestinal microflora.

研究代表者

加藤 幸紀（KATO, Satsuki）

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：50281283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：全身疾患のない正常分娩が予想される健常妊婦と切迫早産と診断された妊婦を被験者とし、歯周組織の炎症状況と女性ホルモン量を比較した、さらに、非刺激唾液、頬・脛・腸管粘膜組織の細菌叢を16S rRNA amplicon解析で比較した。切迫早産妊婦は健常妊婦に比して歯肉炎が増悪していた。さらに炎症症状が強いと子の在胎週数が短くなり、低体重児となることが示された。両群の口腔細菌叢構成に違いが認められた。これらの変化にはプロゲステロン量の低下が影響する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母親の口腔細菌叢の全身と子への影響を検討し、母親の健康な口腔細菌叢の維持が新生児の健康に果たす影響について明らかにできれば、医科歯科に限らず健康増進のための方策としての波及効果が高い。

研究成果の概要（英文）：Gingival inflammation and levels of female hormones were compared between healthy and threatened premature delivery pregnant women. Threatened premature delivery pregnant women had more exacerbated gingivitis than healthy pregnant women. In addition, the inflammatory symptoms were associated with a shorter gestational age and a lower birth weight. Differences were observed in the composition of the oral microbiota of the two groups. Furthermore, these changes may be associated with a decrease in progesterone levels.

研究分野：歯学

キーワード：メタゲノム解析 歯周病治療 妊婦 切迫早産 消化管細菌叢 新生児 プロゲステロン エストロゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔内の常在細菌叢が腸内細菌叢に及ぼす影響に注目が集まっている。歯周炎に罹患した妊婦では早産・低体重児出産のリスクが高まることが知られている。しかし、母親の口腔内細菌叢が子供にどのような影響を与えるのかについては十分に明らかとなっていない。(文献1)

我々は、歯周炎のない妊娠女性の口腔内細菌の中でピフィズス菌が増加し、さらにこのピフィズス菌は歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* が口腔内に増加していると減少してしまうことを明らかにした。母親の健康な口腔細菌叢の維持が新生児の健康に果たす影響が大きいことは、医科歯科に限らず健康増進のための方策としての波及効果が高い。

2. 研究の目的

母親の健康な口腔細菌叢の維持が新生児の健康に果たす影響が大きいことは、医科歯科に限らず健康増進のための方策としての波及効果が高い。新生児は出産時に母親からあるいは周囲の者や環境を介して細菌と接触し、腸内細菌叢が形成される。ピフィズス菌は出産後早期に新生児腸管内で増殖し、感染防御や粘膜免疫系の発達に影響する。しかしピフィズス菌をはじめ新生児に定着する細菌叢の由来については明らかにはなっていない。

本研究では、メタゲノム解析・リアルタイム PCR 法といったマイクロバイーム解析を応用して、母親の口腔環境整備が子の成長発育、免疫能の獲得、および消化管細菌叢形成に果たす役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被検者：全身疾患を伴わない正常分娩が予想される妊娠 35 週の妊婦 30 名と、産科医師により切迫早産と診断された 30 名の妊婦を被検者とした。被検者全員から本研究の同意を得た。なお、本研究は北海道医療大学歯学倫理審査委員会の承認を得ている(承認番号 103、124)。

(2) 検体採取・歯周組織検査の実施：同意取得後、安静時唾液、頬粘膜、腭粘膜、腸管粘膜を採取した。

(3) 歯周組織検査：唾液・頬粘膜採取後、プロービングポケット深さ(PD)、プロービング時出血(BOP)の有無、歯の動揺度を測定した。測定結果から Periodontal epithelial surface area (PESA)、及び Periodontal inflamed surface area (PISA)を算出した。

(4) 女性ホルモン量測定：唾液中のエストロゲン量・プロゲステロン量を、EIA キット(Salivary 17 -Estradiol EIA kit、Salivary Progesterone EIA kit; Salimetrics)を用いて定量した。

(5) マイクロバイーム解析：唾液・頬粘膜・腭粘膜・腸管粘膜から細菌 DNA を抽出し、微生物叢解析として 16S rRNA amplicon sequencing を実施した。

(6) 統計解析：健常妊婦と切迫早産妊婦との間の比較解析は、SPSS 解析ソフト Ver. 26 (IBM) を用いて、Mann-Whitney U 検定、Spearman 相関分析、およびロジスティック回帰分析を実施した。細菌叢解析は PERMANOVA 検定と ANCOM 解析を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) 健常妊婦と切迫早産妊婦の臨床所見比較において、年齢・身長・体重では有意差は認めなかった。切迫早産妊婦は健常妊婦と比較して、在胎週数が有意に短く、子の体重は有意に少なかった。歯周組織検査結果では、切迫早産妊婦は平均 PD が有意に深く、BOP 率が有意に高かった。また、PISA/PESA も有意に高い値となった(表1)。

表 1 健常妊婦と切迫早産妊婦の臨床所見の比較

	健常妊婦 (n = 30)	切迫早産妊婦 (n = 30)	p 値
年齢 (歳)	29.9 ± 4.1 (23 - 40)	29.8 ± 5.9 (17- 42)	0.988
身長 (cm)	157.9 ± 6.3 (148.0 - 168.0)	157.3 ± 5.9 (148.0 - 170.0)	0.590
体重 (Kg)	63.3 ± 8.6 (44.0 - 86.0)	58.3 ± 10.4 (43.3 - 81.4)	0.045
在胎週 (週)	39.1 ± 1.3 (36 - 41)	33.4 ± 4.7 (23 - 39)	0.000
出生時体重 (g)	3042.04 ± 434.62 (2120 - 3775)	2105.32 ± 840.01 (450 - 3210)	0.000
エストロゲン (pg/ mL)	63.96 ± 71.54 (11.89 - 267.0)	48.64 ± 69.99 (1.65- 200.00)	0.010
プロゲステロン (pg/ mL)	1757.54 ± 1608.41 (283.42 - 9187.01)	845.70 ± 1498.43 (61.03 - 7723.59)	0.000
平均PPD (mm)	2.23 ± 0.26 (1.59 - 2.71)	2.51 ± 0.28 (1.6-2.9)	0.000
PPD ≥ 4 mm (%)	1.63 ± 3.84 (0 - 16.13)	6.08 ± 9.07 (0 - 10.71)	0.000
%BOP	8.06 ± 8.50 (0 - 29.57)	21.05 ± 21.58 (0 - 28.6)	0.003
PESA (mm ²)	1218.34 ± 151.86 (891.6 - 1571.2)	1382.77 ± 173.960 (1075.2 - 1799.6)	0.001
PISA (mm ²)	110.30 ± 129.12 (0 - 521.0)	329.45 ± 389.79 (0 - 1676.1)	0.005

(2) 健常妊婦と比較して切迫早産妊婦では、プロゲステロン量・エストロゲン量は有意に低かった (表 1)。さらにプロゲステロン量は在胎週数と子の体重とで正の相関、4 mm以上のポケット率・%BOP・PISA との間に負の相関が認められた (表 2)。切迫早産を従属変数としたロジスティック回帰分析では、プロゲステロン量の低下あるいは 4 mm 以上のポケットを有する割合が高いと切迫早産のリスクが高いことが示された (表 3)。これらの結果から、切迫早産の要因の一つとして、プロゲステロン量の低下があり、またプロゲステロン量は歯周組織の炎症状況に影響する可能性が示された。

表 2 女性ホルモンと臨床所見との相関関係

	エストロゲン		プロゲステロン	
	相関係数	p 値	相関係数	p 値
年齢 (歳)	-0.089	0.503	0.016	0.902
身長 (cm)	0.025	0.851	-0.158	0.231
体重 (Kg)	0.234	0.075	0.111	0.404
平均PPD (mm)	-0.216	0.103	-0.258	0.051
PPD ≥ 4 mm (%)	-0.166	0.213	-0.341	0.009
%BOP (%)	-0.169	0.206	-0.287	0.029
PESA (mm ²)	-0.151	0.258	-0.202	0.128
PISA (mm ²)	-0.176	0.185	-0.273	0.038
子の体重 (g)	0.200	0.155	0.464	0.001

Spearman相関分析

表 3 ロジスティック回帰分析

	回帰係数	標準誤差	Wald ²	p 値	オッズ比	95% 信頼区間	
						下限	上限
プロゲステロン	-3.401	0.874	15.142	0.000	0.033	0.006	0.185
PPD 4 mm (%)	2.489	0.873	8.136	0.004	12.048	2.178	66.627
(定数)	1.405	1.551	0.820	0.365	4.075		

従属変数：切迫早産

(3) メタゲノム解析の結果、唾液(S)・頬粘膜(O)・腔粘膜(V)・腸管粘膜(A)には各々固有の細菌叢が検出された。さらに頬粘膜の細菌叢では健常妊婦(H)と切迫早産妊婦(PB)の α -diversity に有意な差が認められた(図1)。メタゲノム解析の結果から機能予測解析を行なったところ、統計学的有意差が得られたパスウェイに superpathway of menaquinol-8 biosynthesis I、superpathway of heme b biosynthesis from glutamate、superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)があった(図2)。統計学的有意差が得られたパスウェイに superpathway of menaquinol-8 biosynthesis I、superpathway of heme b biosynthesis from glutamate、superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)があった。

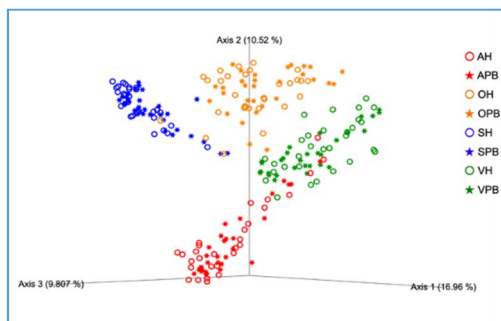


図1 PCoA 解析

(4) 以上の結果から、歯周組織に炎症症状が認められると、子の在胎週数が短くなり、低体重児となる可能性があることが示された。さらに、妊婦のプロゲステロン量低下が歯周組織の炎症と口腔微生物叢構成に影響する可能性が示唆された。

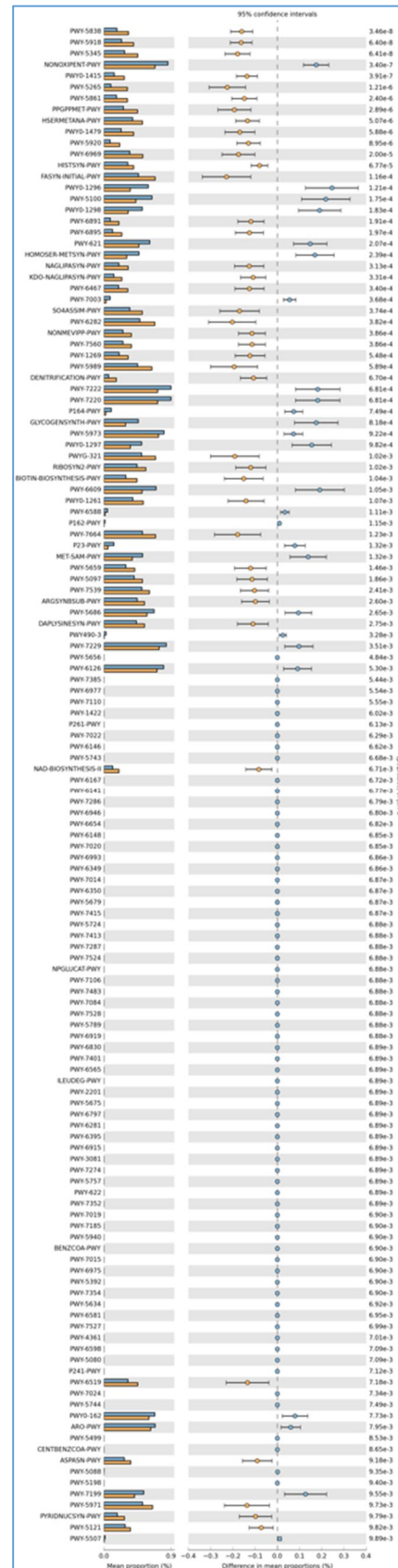


図2 機能予測解析

< 引用文献 >

1. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J: The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014, 6(237):237ra265.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugiyama N, Uehara O, Morikawa T, Paudel D, Ebata K, Hiraki D, Harada F, Yoshida K, Kato S, Nagasawa T, Miura H, Abiko Y, Furuichi Y.	4. 巻 Mar 25
2. 論文標題 Gut fora alterations due to lipopolysaccharide derived from Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-022-00703-x	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山のどか、植原治、江端一馬、加藤幸紀、安彦善裕、長澤敏行、古市保志
2. 発表標題 P. gingivalisのLPSがマウス腸内細菌に与える影響
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Toshiyuki Nagasawa, Satsuki Kato, Yasushi Furuichi	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana, New York, NY	5. 総ページ数 256
3. 書名 Periodontal Pathogens -Methods and Protocols- p185-193	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	長澤 敏行 (NAGASAWA Toshiyuki) (90262203)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植原 治 (UEHARA Osamu) (00709248)	北海道医療大学・歯学部・講師 (30110)	
研究分担者	古市 保志 (FURUICHI Yasushi) (80305143)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関