

平成30年9月6日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14820

研究課題名(和文)野生チンパンジーにおける口腔細菌叢の伝播と食物分配

研究課題名(英文)Transmission of oral microbiotic species and food sharing in wild chimpanzees

研究代表者

橋本 千絵 (hashimoto, chie)

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：40379011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：野生チンパンジーの口腔細菌叢を再構成し、食物分配が歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis*等)の感染に影響を与えるという仮説の検証を試みた。2016～2017年においてカリンズ森林で5種の霊長類から200以上の口腔由来の新鮮な食塊に付着する唾液試料を採取し、このうち80試料からDNA抽出および細菌に共通する16SrRNAコード領域(V1-V2)の増幅に成功した。カリンズ森林保護区の動物から口腔細菌叢を復元されたのは本研究が初めてである。現在行っている個体間および種間比較解析の結果は第34回日本霊長類学会で発表し、国際英文誌に投稿する予定である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish the method to reconstruct oral flora from deposited food remnants with attached saliva in wild chimpanzees. By comparison of oral flora composition between primate species, we tested the hypothesis that food sharing would facilitate the transmission of oral microbiotic species including major pathogenetic bacteria such as *porphyromonas gingivalis*. We collected over two hundred samples in the Kalinzu Forest, Uganda in 2016 and 2017. The sampled primate species ranged from chimpanzees, blue monkey, red-tailed monkey, I'Hoest's monkey, and abyssinian black-and-white colobus. We analyzed over 80 samples and succeeded in the extraction and amplification of universal DNA sequence segment (V1-V2) in 16SrRNA coding region. This is the first data of oral bacterial flora from wild animals in Kalinzu. We will present the results of this study in the 34th annual meeting of Primate Society of Japan and will publish them in international journals.

研究分野：人類学

キーワード：チンパンジー 口腔細菌叢 歯周病 食物分配 カリンズ森林 次世代シーケンサー 共進化 野生霊長類の比較研究

1. 研究開始当初の背景

野生チンパンジーにおける歯周病の発見

研究代表者を中心とするグループは 1992 年からウガンダ共和国カリンズ森林保護区においてチンパンジーの社会学的・生態学的研究を行ってきた。その過程でチンパンジーの死体を発見した場合には骨格標本として保存し、現在オトナ 4 個体、コドモ 3 個体、アカンボウ 1 個体の骨格標本がカリンズ森林内にある研究基地に保管されている。そのうち、すべてのオトナ個体で歯周病が観察された(Shimizu et al., 2013)。

骨格資料に基づいた歯周病比較病理学

文献調査および、研究分担者である清水らによる長期野外調査地で、各国博物館に収集・保管されている類人猿の骨格の観察 (Kilgore, 1989; Lovell, 1990; Shimizu et al., 2002; Shimizu, 2015) やキツネザルの捕獲調査 (Cuozzo & Sauter, 2006; Sauter et al., 2014) などから、その他のヒト以外の霊長類に関しても歯周病が存在することがわかってきた。清水らのまとめによれば、博物館に所蔵されている野生類人猿の歯周病の種間比較から歯周病の発症率に大きな種間変異がある(チンパンジーやボノボでは 65% 程度と高く、ニシゴリラで 34% やボルネオオランウータンでは 15% と低い)ことが指摘された (Shimizu, 2015)。これらの野生類人猿の歯周病の種間比較から、研究代表者らは食物分配を頻繁に行う種 (チンパンジーとボノボ) で歯周病の罹患率が高く、そうでない種 (ニシゴリラ、ボルネオオランウータン) で罹患率が低いことが示され、食物分配によって歯周病が伝染するとの仮説に着想した (Shimizu et al., 2013; Shimizu, 2015)。

歯周病菌の細菌学

歯周病はヒトの場合 *Porphyromonas gingivalis* をはじめとする複数のグラム陰性偏性嫌気性細菌により引き起こされる炎症性の感染症である。歯周病原因菌はタンパク質やアミノ酸を栄養源とし、口腔内に常在する細菌である。歯周病は口腔内環境の悪化にともない歯周病原因菌が増殖し、原因菌からの病原因子が宿主側の炎症反応を誘発し歯周組織を破壊することで起こる。

遺伝子配列解読に基づく細菌叢同定法導入

体内に寄生する細菌叢はこれまで培養技術に依存していたため、難培養である歯周病菌などの偏性嫌気性菌の検出が難しかった。2000 年代後半から利用が可能となった次世代シーケンサーにより、歯周病の原因菌を含む口腔細菌叢全体をフローラ単位で検出し、比較できるようになった。研究分担者である矢野ら (2016) はこれらの技術を用いて線香的に日本モンキーセンターで飼育されてい

たレッサースローロリスから歯垢と唾液を採取し、口腔内の細菌の DNA を解析した結果、ヒトの歯周病の主な病原菌である *Porphyromonas gingivalis* の DNA と非常に似た DNA を検出した (矢野他, 2016)。このことは口腔細菌種が霊長類系統間で変異を持っていること、通常は歯周ポケットの深部に存在している偏性嫌気性菌であっても唾液中から検出できることがわかった。

カリンズ群からの唾液試料採取

研究チームが対象としたウガンダ共和国カリンズ森林保護区においてチンパンジー群は全て個体識別が可能であり、清水らの先行調査により、果実が豊富な時期に樹上で噛みしだいた果実線維の残り(ワッジ)や食べ残した果実片が容易に採取することができることがわかった。

食物分配による歯周病伝播の検証

このような背景から本研究では、長期調査地(ウガンダ共和国カリンズ森林保護区)で得た食渣標本から、細菌 DNA を抽出し、次世代シーケンサーによってその試料が含有する理論上すべての細菌種の検出を行うことで、野生チンパンジーの口腔内細菌叢を復元し、観察研究で得られた食物分配の記録と比較することで、「食物分配によって歯周病が感染する」との仮説の検証を行うことになった。

2. 研究の目的

野生チンパンジー歯周病菌伝播の解明

長期調査地で採集された骨格標本の観察から野生チンパンジーは高頻度で歯周病に罹患していることが知られていたが、これまでその感染経路に言及する研究はなかった。博物館に収蔵されている野生類人猿の骨格標本の比較研究から食物分配の頻度と関連が強いことが示された。一方で次世代シーケンサーの登場により、唾液試料から歯周病の原因菌を含む口腔細菌叢をフローラ単位で比較できる技術が利用可能となった。本研究では、長期調査地で得た食渣標本から、野生チンパンジーの口腔内細菌叢を復元し、観察研究で得られた食物分配の記録と比較することで、「食物分配によって歯周病が感染する」との仮説の検証を行う。

細菌自然史学の構築

また本研究は萌芽研究として、次の時代の研究分野を開拓するものである。本研究ではターゲットのサーチイメージとして *P. gingivalis* を持つが、次世代シーケンサーから得られる細菌叢データには *P. gingivalis* 以外の多くの代表的歯周病菌種を含めて膨大な菌種の系統解析が可能である。ヒトの *P. gingivalis* のようにレッサースローロリスで発見された細菌株との共通祖先が宿主であ

る霊長類の進化とともに進化してきたのであれば、霊長類系統と歯周病原菌系統における共進化仮説の検証が可能となる。宿主側動物種は共通祖先から分かれて、食性・形態・行動を変化させながら異なる生息地に進出していく。入れ子のように菌はその変化を自身の環境変化として捉え、適応すべく2次的に共進化していく。宿主の系統をガイドとすることでその菌がいつ・どこで・どのように進化してきたのかを推定することが可能である。現在の口腔細菌の姿に至る時空間的な軌跡は、細菌を主人公にしたの自然史といえるものである。ヒトの身体も自然史の観点から近縁霊長類との連続性・相違性で捉えることで本質的な理解が可能になるが、同じように口腔細菌も由来から考えることでその性質の本質的な理解を得ることができるだろう。本研究の萌芽的調査が、研究チームによって築かれる研究体制は、宿主の口腔への適応進化という細菌の自然史から病原菌の出現を考察するという、これまでの臨床医歯学から発想されなかった新しい研究分野の基盤構築を目指す。

飼育動物の口腔ケアへの貢献

現在の獣医学部のカリキュラムではヒトと歯科学に相当する分野が含まれず、対策が遅れている。本研究でえられた知見は貴重な基礎データとして獣医学分野にフィードバックされ、飼育動物の口腔ケア向上への貢献を視野に入れて行われる。カ霊長類からの追加試料として国内の動物園施設から試料を得ることで本研究のデータ蓄積を行う一方で、研究チームが学会発表、論文の形でまとめた知見は、可及的速やかなに動物園施設に提供され、口腔ケア向上のために還元される。近年高齢化に伴い、国内動物園でも飼育動物の口腔内環境の悪化が懸念されている動物園への基礎的データのフィードバックは、これまで手探りで治療方針を採っていた動物園での歯科医療の向上をもたらす可能性を秘めており、動物園を通して種の多様性の保全への貢献に貢献できる。

3. 研究の方法

ウガンダ共和国カリンズ森林保護区で 2016 - 2017 年 2 回の現地調査を行い、ワッジや果実片に付着した霊長類種の唾液からの細菌 DNA 試料収集を行った。カリンズ森林保護区に在る 45 頭のチンパンジーに加えて同所的に生息する 8 頭のブルーモンキー、3 頭のレッドテイルモンキー、4 頭のロエストモンキー、1 頭のアビシニアコロブスから、唾液の付着したワッジと果実片を、研究チームメンバーと現地トラッカーが採取した。保存液に常温保存された試料を日本の移送した。また追加試料として、円山動物園(札幌市)、旭山動物園(旭川市)、東山動物園(名古屋市)、多摩動物公園(東京都)から提供を受けた 6 頭の

オランウータンから唾液試料を得た。保存された試料を、研究代表者が所属する京都大学霊長類研究所で、細菌 DNA 抽出、ユニバーサルプライマーによる PCR 増幅、DNA 精製、ライブラリ作成、次世代シーケンサーによる配列解読、バイオインフォマティクス解析による細菌叢の個体間変異分析を以下の方法で行った。

DNA 抽出

Lysis Buffer に保存されたサンプルから、土壌サンプル用 DNA 抽出用キット (NucleoSpin® Soil, U0780B、Machery Nagel 社)を用いて、ビーズ法での DNA を抽出を行った。Qubit dsDNA HS Assay Kit(ライフテクノロジーズジャパン)を用いて、抽出の確認を行った。

ユニバーサルプライマーによる PCR 増幅
細菌に共通する 16SrRNA コード領域の内、DNA 領域の変異が出やすい可変部 (V1-V2) をユニバーサル(共通)プライマーで PCR 増幅した。

DNA 精製

AmPure XP Kit(ベックマン社)を用いて、磁性ビーズ法により増幅産物を精製した。

ライブラリ作成

Nextra XT Index Kit v2 Set A (96 Indices, 384 Samples, illumina 社)を用いて、増幅産物に固有タグのプライマーを付与し PCR 増幅し、1 つのライブラリとして等量混合した。

次世代シーケンサーを用いた試料中の細菌叢構成の復元

京都大学所蔵の次世代シーケンサー (Miseq, Illumina 社)によって、サンプル内に含まれる細菌遺伝子の塩基配列を出力した。

バイオインフォマティクス解析による細菌叢の個体間変異分析

希釈度曲線グラフの安定を基準としてクオリティーチェックし、十分なリードの株を抽出後、キメラなどの本来試料になかったはずの塩基配列を除去した。選別されたリードを塩基配列の相違から種に相当する株を同定し、その相対数から各サンプル数に含まれる細菌叢の構成を再現した。得られた菌種株は NCBI や CDBJ などのデータベースに参照して大まかな同定がされる。歯周病菌の候補となる細菌は、既知の菌との相同性を調べる(相同性検索)。既知の個体間関係と菌叢の相対的相違を照合する。個体間距離と菌叢距離の相関を検証することで、「食物分配によって歯周病が感染する」との仮説の検証を行った。

4. 研究成果

本萌芽研究助成では、「チンパンジーに見られる食物分配行動などの個体間接触が口腔疾患の感染性に寄与している」という仮説を検証することを目的として、2016-17 年度の 2 年間ウガンダ共和国カリンズ森林保護区における野生チンパンジーを中心とする霊長類口腔細菌のサンプリングを行い、その遺

伝子解析を行った。唾液には無数の口腔細菌が存在し、宿主種の口腔環境の中で共生している。我々はや噛みしがんだ食渣塊("ワッジ")などから採取した唾液試料から細菌 DNA を抽出後、細菌の共通領域(V1-V2)を PCR 増幅し、次世代シーケンサーを用いてその配列多様性を決定して歯周病の原因菌を含む口腔細菌叢の包括的な復元を行った。

本研究ではカリンズ森林保護区内に生息する(Mグループ)を中心に45頭からサンプルを採取した。同保護区は京都大学霊長類研究所のチームが長年に渡り観察調査を続けて来ており、研究代表者の橋本千絵(京都大学霊長類研究所)は現在カリンズ保護区でのフィールド責任者である。これまでの研究で蓄積された個体の家族関係および成長後の群れ移動などの個体データを活用した。本研究では外群としてチンパンジーと同所的に生息しているがチンパンジー程食物分配などの接触機会が少ない3種のオナガザル(アカオザル(*Cercopithecus ascanius*)、ブルーモンキー(*Cercopithecus mitis*)、ロエストモンキー(*Cercopithecus l'oeesti*))とアピシニアコロブス(*Colobus guereza*)から唾液サンプルを採取し、その歯周病原性細菌および口腔細菌叢全体の多様性を比較した。比較となる他の霊長類の比較データが不足していたことから、本研究では国内の7ヶ所の動物園(犬山市の日本モンキーセンター、名古屋市の東山動物園、東京都の多摩動物公園、札幌市の円山動物園、旭川市の旭山動物園、横浜市のズーラシア)と共同研究を開始し、広範な種類の霊長類からの口腔細菌データの蓄積を行った。これまでに曲鼻猿類(レススローロリス(*Nycticebus pygmaeus*))6頭から計84ヶ所、類人猿オランウータン2種(ボルネオ(*Pongo pygmaeus*)、スマトラ(*Pongo abelii*))7頭から計64ヶ所の細菌叢のDNA抽出が完了している。

現在までに、採取されたサンプルの内、カリンズで得られた5種の野生霊長類試料、国内動物園で得られた2種の飼育霊長類由来の唾液試料からDNA抽出を行い、細菌共通領域(V1-V2)をPCR増幅し、精製を行った後に、次世代シーケンサーを用いてその配列を解読した結果、カリンズ試料からは仮説を検証するために必要なデータをカリンズ試料から得ることに成功している。歯周病の原因菌を含む口腔細菌叢の詳細な種内/種間多様性比較の結果は学会発表(第34回日本霊長類学会)後、英文専門誌に投稿される予定である。国内動物園から得られた飼育霊長類由来の試料の解析は2回に分けて行っており、このうち先行して解析を行った日本モンキーセンターが飼育する歯周病例のレススローロリスの細菌叢データを第33回霊長類学会および第59回歯科基礎医学会研究会で発表し、高い評価を受けた。現在、英文専門誌に投稿を準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Oishi Motoharu, Ogihara Naomichi, Shimizu Daisuke, Kikuchi Yasuhiro, Endo Hideki, Une Yumi, Soeta Satoshi, Amasaki Hajime, Ichihara Nobutsune, Multivariate analysis of variations in intrinsic foot musculature among hominoids, *Journal of Anatomy*, 査読有, 232 巻, 2018, 812-823, doi:10.1111/joa.12780

Tsubamoto Takehisa, Kunimatsu Yutaka, Sakai Tetsuya, Saneyoshi Mototaka, Shimizu Daisuke, Morimoto Naoki, Nakaya Hideo, Nakatsukasa Masato, Listriodontine Suid and Tragulid Artiodactyls (Mammalia) from the Upper Miocene Nakali Formation, Kenya, *Paleontological Research*, 査読無, 21 巻, 2017, 347-357, doi:10.2517/2016PR034

Burgunder J., Pafčo B., Petrželková K.J., Modrý D., Hashimoto C., MacIntosh A.J.J., Complexity in behavioural organization and strongylid infection among wild chimpanzees, *Animal Behaviour*, 査読有, 129 巻, 2017, 257-268, <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.06.002>

Hashimoto Chie, Ape Field Studies, *International Encyclopedia of Primatology*, 査読有, 1 巻, 2017, 1-4, <https://doi.org/10.1002/9781119179313.wbprim0414>

Mapua MI, Petrzelkova KJ, Burgunder J, Dadakova E, Brozova K, Hrazdilova K, Stewart FA, Piel AK, Vallo P, Fuehrer H, Hashimoto C, Modry D, Qabian MA, A comparative molecular survey of malaria prevalence among Eastern chimpanzee populations in Issa Valley (Tanzania) and Kalinzu (Uganda), *Malaria Journal*, 査読有, 15 巻, 2016, 423, doi:10.1186/s12936-016-1476-2

[学会発表](計23件)

橋本千絵、リュフンジン、毛利恵子、清水慶子、古市剛史、野生ボノボと野生チンパンジーにおけるメスの性ホルモン動態について、第32回日本霊長類学会大会、2016年7月17日、鹿児島県鹿児島市

Koops K, Schoning C, Isaji, Hashimoto C, Cultural differences in ant-dipping tool length between neighbouring chimpanzee communities at Kalinzu, Uganda, 第26回

国際霊長類学会大会、2016年08月24日、シカゴ(アメリカ合衆国)

Ryu H, Hashimoto C, Mouri K, Shimizu K, Hill DA, Furuichi T.、Can male bonobos (*Pan paniscus*) determine the peri-ovulatory period with some precision?、第26回国際霊長類学会大会、2016年08月25日、シカゴ(アメリカ合衆国)

Hashimoto C, Ryu H, Mouri K, Shimizu K, Furuichi T.、Female reproductive monitoring and miscarriage in wild bonobos at Wamba, Democratic Republic of Congo and chimpanzees in Kalinzu Forest, Uganda.、第26回国際霊長類学会大会、2016年08月25日、シカゴ(アメリカ合衆国)

橋本 千絵、伊左治 美奈、松尾 ほだか、日本アフリカ学会第53回学術大会、2016年06月05日、神奈川県藤沢市

橋本 千絵、野生ボノボにおける出産後の発情再開について、第46回ホミニゼーション研究会、2017年03月24日、愛知県犬山市

早川 卓志、田代 靖子、橋本 千絵、五百部 裕、今井 啓雄、同所的に生息する野生グエノン3種における全遺伝子配列の比較解析、第61回プリマーテス研究会、2017年01月28日、愛知県犬山市

峠 明杜、早川 卓志、岡本 宗裕、橋本 千絵、湯本 貴和、カリンズ森林に同所的に棲息するグエノン3種の食性比較 ~ 昆虫食に着目して~、第61回プリマーテス研究会、2017年01月28日、愛知県犬山市

峠 明杜、早川 卓志、岡本 宗裕、橋本 千絵、湯本 貴和、同所的に生息するグエノン(*Cercopithecus* 属)3種における食性の種間比較、第64回日本生態学会大会、2017年03月15日、東京都新宿区

清水 大輔、橋本 千絵、五百部 裕、ウガンダ、カリンズ森林に生息するコロプスとグエノンの食物の堅さ、第70回日本人類学会大会、2016年10月10日、新潟県新潟市

橋本 千絵、Heungjin R, 毛利 恵子、坂巻 哲也、清水 慶子、古市 剛史、日本アフリカ学会第54回学術大会、2017年5月20日、長野県長野市

Hashimoto C、Post-parturition resumption of ovarian cycles and reproduction by female、The 2cd African Primatological Consortium conference、2017年8月、キンシャサ(コンゴ民主共和国)

Hashimoto C、Introduction of research sites: Wamba, DRC for wild chimpanzees、International Symposium on Utilization of Field Sites in Research and Education、2017年12月8日、京都府京都市

Akito T, Hayakawa T, Okamoto M, Hashimoto C, Yumoto T.、DNA metabarcoding reveals diet overlap among sympatric three species of forest guenons (*Cercopithecus*) in Uganda、第12回国際哺乳類学会大会、2017年7月、パース(オーストラリア)

峠 明杜、早川 卓志、岡本 宗裕、橋本 千絵、湯本 貴和、行動観察と糞虫 DNA 分析から探る森林棲オナガザル3種の昆虫食、第62回プリマーテス研究会、2018年1月、愛知県犬山市

峠 明杜、早川 卓志、岡本 宗裕、橋本 千絵、湯本 貴和、アフリカのオナガザル3種はおなじ昆虫を食べているか - 糞DNAから探る採食戦、第65回日本生態学会大会、2018年3月15日、北海道札幌市

峠 明杜、早川 卓志、岡本 宗裕、橋本 千絵、湯本 貴和、霊長類の昆虫食におけるニッチ重複、第34回日本霊長類学会、2017年7月14日、東京都練馬区

矢野 航、清水 大輔、早川 卓志、橋本 千絵、ウガンダ・カリンズ森林保護区で同所的に生息する霊長類5種の口腔細菌叢の比較、第34回日本霊長類学会、2016年7月15日、東京都練馬区

矢野航、清水大輔、寺尾由美子、岡部直樹、早川卓志、JMC 飼育レッサースローロリス口腔内の歯周病原性細菌叢の網羅的探索およびその空間的変異と経時的変化、第62回プリマーテス研究会、2018年1月、愛知県犬山市

矢野 航、渡邊 竜太、佐藤 和彦、園村 貴弘、江尻 貞一、次世代シーケンサーを用いた霊長類レッサースローロリス(*Nycticebus pygmaeus*)に特異的な歯周病関連菌の探索、第59回歯科基礎医学会、2017年9月17日、長野県塩尻市

②矢野 航、清水 大輔、寺尾 由美子、岡部 直樹、早川 卓志、レッサースローロリス(*Nycticebus pygmaeus*)個体内において部位間で異所的に適応する細菌叢、第33回日本霊長類学会、2017年7月、福島県福島市

②中村 千晶 佐橋 智弘 吉田 淳一 高倉 健一郎 矢野 航 久世 濃子、オランウータンのお口はきれい? オランウータ

ンの口はキレイ? ~ 「細菌カウンタ」による
菌数測定、動物園大学 8、2018 年 3 月 21 日、
広島県広島市

②中村 千晶、矢野 航、久世 濃子、オラ
ンウータン・ジプシーの歯周組織検査、第 62
回プリマーテス研究会、2018 年 1 月、愛知県
犬山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 千絵 (HASHIMOTO, Chie)
京都大学・霊長類研究所・助教
研究者番号：40379011

(2) 研究分担者

矢野 航 (YANO, Wataru)
朝日大学・歯学部・助教
研究者番号：80600113

清水 大輔 (SHIMIZU, Daisuke)
中部学院大学・看護リハビリテーション学
部・講師
研究者番号：60432332

(3) 連携研究者

早川卓志 (HAYAKAWA, Takushi)
京都大学・霊長類研究所・特定助教
研究者番号：00758493

(4) 研究協力者

なし