

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21704

研究課題名（和文）異分野融合研究による女性ホルモンの変動と口腔マイクロバイオームの関連の解明

研究課題名（英文）Elucidating the relationship between female hormone and the oral microbiome changes through interdisciplinary research

研究代表者

向井 加奈恵（MUKAI, KANAE）

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：30755335

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクス解析技術を用い、女性ホルモンの変動と口腔マイクロバイオームの関連について明らかにすることを目的とした。結果として、Streptococcus属の相対存在比は卵胞期で黄体初期および黄体後期よりも有意に高く、Prevotella 7およびPrevotella 6の相対存在比は卵胞期で黄体初期および黄体後期よりも有意に低いことが明らかとなった。また、Simpson指数による多様性は卵胞期で黄体初期に比べて有意に低かった。以上より、健康成人女性の月経周期における特徴的な口腔細菌叢の変化が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクス解析技術を用い、女性ホルモンの変動と口腔マイクロバイオームの関連について明らかにすることを目的として実施し、健康成人女性の月経周期における特徴的な口腔細菌叢の変化を示した。本研究課題の成果により、マイクロバイオーム制御因子としてのエストロゲンの役割が明らかとなり、女性の健康を支えるマイクロバイオームの重要性を示し、新たな看護ケア方策の一助となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to assess potential changes in the oral microbiome of healthy young adults using next generation sequencers and bioinformatics analysis technologies. As a results, the follicular phase had a significantly higher abundance ratio of the Streptococcus genus than the early and late luteal phases, whereas the abundance ratios of the Prevotella 7 and Prevotella 6 genera were significantly lower in the follicular phase than those in the early and late luteal phases and that in the early luteal phase, respectively. And, alpha diversity by the Simpson index was significantly lower in the follicular phase than that in the early luteal phase. These results showed that the oral microbiome profiles are affected by the menstrual cycles of healthy young adult females.

研究分野：基礎看護

キーワード：女性ホルモン エストロゲン 異分野融合 マイクロバイオーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンは健康な生活維持に必要な不可欠な物質であり、正常な分泌維持が wellness 向上には重要である。しかしながら、口腔に限っては正常な分泌がネガティブな影響を与えてしまうため、注意が必要である。妊娠による女性ホルモンの増加が歯周病の原因菌である *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) を増加させ (Kornoman et al., 1980) 容易に妊娠性歯肉炎に至ると言われている。さらに近年においては、性周期による女性ホルモンの変化も唾液中の *P. intermedia* 数に影響を与える (Kawamoto et al., 2010 & 2012) との報告が散見し始めている。口腔の常在菌細菌叢 (マイクロバイオーム) のバランス破綻は歯周病等の局所感染症に留まらず、全身性感染症にも波及する可能性があり (Gomerz et al., 1997 & Gibbs., 2001) 健康・QOL に多大な影響を与える。そのため、口腔マイクロバイオームと女性ホルモンの関係を明らかにすることは wellness 向上に重要である。

細菌を対象とした調査では、培養法や定性 PCR 法によって特定の細菌を調べる方法が世界的に普及している (渡辺ら 2006; Kawamoto et al., 2010 & 2012) ）。しかしこの方法では、着目した特定の細菌のみが解析対象となるため、結果にバイアスがかかる課題がある。近年、次世代シーケンサー (NGS) とバイオインフォマティクス解析 (生命情報科学) 技術の登場により、細菌の網羅的解明が可能となった。2010 年以降関係論文数は増加しはじめ、皮膚・口腔マイクロバイオーム研究は腸内細菌に次ぐホットピックとなりつつある。しかしながら、女性ホルモンの変動と口腔マイクロバイオームの関連に関して NGS 等を活用した調査は報告されておらず、両者の関係性に関しては十分に明らかになってはいない。

2. 研究の目的

本研究課題は、女性ホルモンの変動と口腔マイクロバイオームの関連について NGS とバイオインフォマティクス解析を用いて網羅的に明らかにすることを目的とする。本研究課題が明らかとなることで、女性の健康を支えるマイクロバイオームの重要性を示し、新たな看護ケアの方策の一助となる。

3. 研究の方法

(1) 対象

性周期が安定しており、調査開始 1 か月前にホルモン剤または抗菌薬の服用が無い健康成人女性と調査開始 1 か月前に抗菌薬の服用が無い成人男性をそれぞれリクルートした。

(2) サンプル収集

月経開始日から翌月の月経開始までの 1 か月間、毎日起床時に婦人体温計 (ET-C531PP, テルモ株式会社) にて基礎体温測定後、歯磨き前に流涎で唾液を採取 (Saliva Collection Aid, Salimetrics) した。成人男性は任意の 1 か月の間、歯磨き前に流涎で唾液を採取した。採取した唾液は -80°C フリーザーにて分析開始まで保管した。個人調書 (年齢、身長、体重、月経周期) や基礎体温、口腔内の症状について記録用紙に記載した。

(3) サンプル分析

細菌 DNA 抽出

サンプルを解凍後に遠心分離し、上清のみを分注した。キットを用いて細菌 DNA を抽出 (Pathogen Lysis Tube S, QIAGEN; QIAamp UCP Pathogen Mini Kit, QIAGEN) した。

次世代シーケンサー分析

細菌 DNA を鋳型として MiSeq システム (Illumina) の 16S rRNA メタゲノミクスプロトコルに従い 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域のライブラリーを調製 (KAPA HiFi Hot Start Ready Mix, KAPA BIOSYSTEMS) した。その後クリーンアップ (AMPure XP, Beckman Coulter) し、MiSeq シーケンサー (Miseq Reagent Kit v3 and PhiX Control v3, Illumina) でリードデータを取得した。

マイクロバイオーム解析

得られたリードデータは QIIME2 プログラム (Caporaso et al., 2010) (<https://qiime2.org/>) で解析した。DADA2 プラグイン (Callahan et al., 2016) を用いてクオリティチェックとキメラチェックを行った。また、SILVA 16S rRNA データベース Ver.123 (Quast et al., 2013) を用いて分類した。Raw リードデータは DNA Bank of Japan (Accession number: DRA015154) に登録済である。

定量的 PCR 分析

16S rRNA 遺伝子の一部 (領域 321-524) を標的とする定量的 PCR (Quantifast SYBR kit, QIAGEN) を行った [Forward 5'-(ACTGAGAYACGGYCCA)-3' and Reverse 5'-(CTGCTGGCACGDAGTTAGCC)-3']。マイクロバイオーム解析で得られた相対存在比にコピー

数を乗じて菌量を算出した。

(4) データ分析

性周期の同定

産婦人科医と助産師数名にコンサルを依頼し、基礎体温を元に排卵時期並びに性周期を推定した。また、一部の対象者については ELISA キット (Progesterone EIA kit, SALIMETRICS) を用いて唾液中プロゲステロン濃度を測定し、性周期推定の補足データとした。黄体期の前半と後半はそれぞれ卵胞期と月経の影響を受ける可能性があるため、黄体期は 2 つのフェーズに分けることとし、月経期・卵胞期・黄体前期・黄体後期の 4 期に分けてデータを比較した。健康成人男性のデータは、1 週間毎で比較した。

統計解析

データは箱ひげ図で示し、フリードマン検定とボンフェローニ検定を行った。 α 多様性は Simpson、Shannon、Chao1 の指標を用いて算出した。 β 多様性は Bray-Curtis で算出し、permutational multivariate analysis (PERMANOVA) を行った。全ての解析は SPSS version 24 (IBM) または R version 4.1.1 を用いた。

(5) 倫理的配慮

本研究は金沢大学医学倫理委員会の承認を得た上で実施した (承認番号: 953-1)。

4. 研究成果

(1) 対象者の属性

健康成人女性 11 名 (年齢: 23-36 歳、BMI: 18.0-30.6、月経周期: 25-43 日) と健康成人男性 5 名 (年齢: 22-32 歳、BMI: 18.7-34.5) が本調査の対象となった。いずれの対象者も調査期間中に口腔内トラブル (口内炎など) は自覚していなかった。

(2) 口腔内細菌叢の上位 20 細菌属の存在比

本調査の対象者の口腔内細菌叢は Streptococcus、Prevotella、Veillonella、Porphyromonas、Nisseria ならびに Gemella から構成されている (図 1)。Prevotella に関しては、Prevotella 7、Prevotella 6、Prevotella (unnumbered) が検出された。

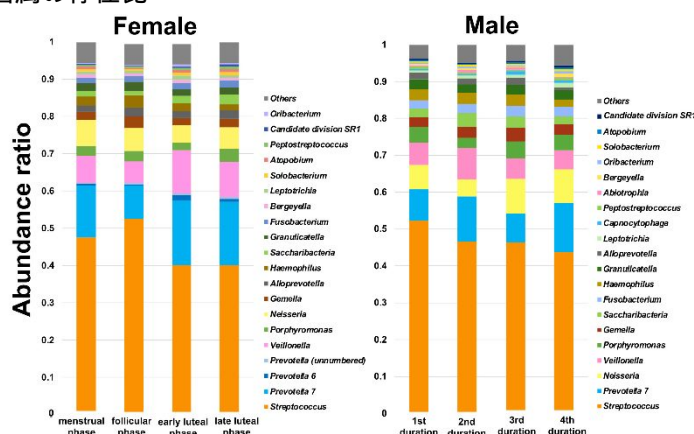
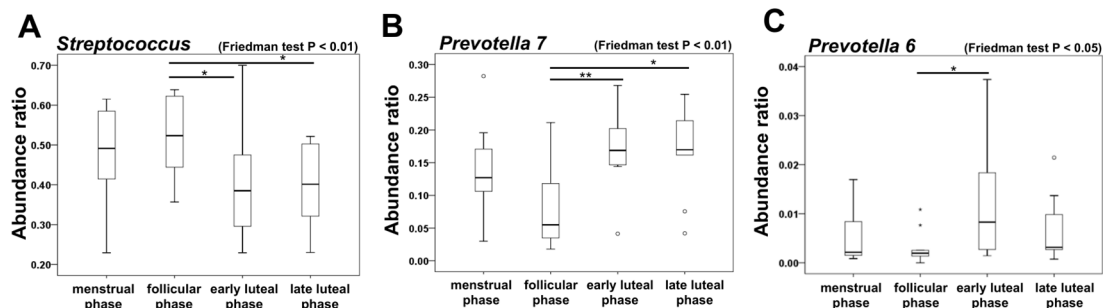


図 1 口腔内細菌叢の上位 20 細菌属の存在比

健康成人女性において、口腔内細菌叢の上位 20 細菌属の存在比に関して性周期における特徴的な変化が確認された。卵胞期における Streptococcus の存在比は黄体前期および黄体後期の存在比よりも有意に高かった ($p < 0.05$) (図 2A)。また、Prevotella 7 の卵胞期における存在比は黄体前期および黄体後期の存在比よりも有意に低く ($p < 0.05$) (図 2B)。Prevotella 6 の卵胞期における存在比は黄体前期よりも有意に低かった ($p < 0.05$) (図 2C)。一方、健康成人男性においては、口腔内細菌叢の上位 20 細菌属の存在比に関して 1 週間毎の有意な変化は確認されなかった。



(3) 口腔内細菌叢の多様性 健康成人女性における各細菌属の存在比

健康成人女性において、口腔内細菌叢の多様性に関して性周期における統計学的に有意な変化

が確認された。 α 多様性指標のうち、卵胞期における Simpson 指数は黄体前期の指数よりも有意に低く ($p < 0.05$)、黄体後期の指数よりも低い傾向 ($p = 0.064$) があつた (図 3A)。また、 β 多様性について、性周期における統計学的有意差が確認された ($p < 0.01$) (図 3B)。一方、健康成人男性においては、口腔内細菌叢の多様性 (α 多様性、 β 多様性) に関して 1 週間毎の統計学的に有意な変化は確認されなかつた。

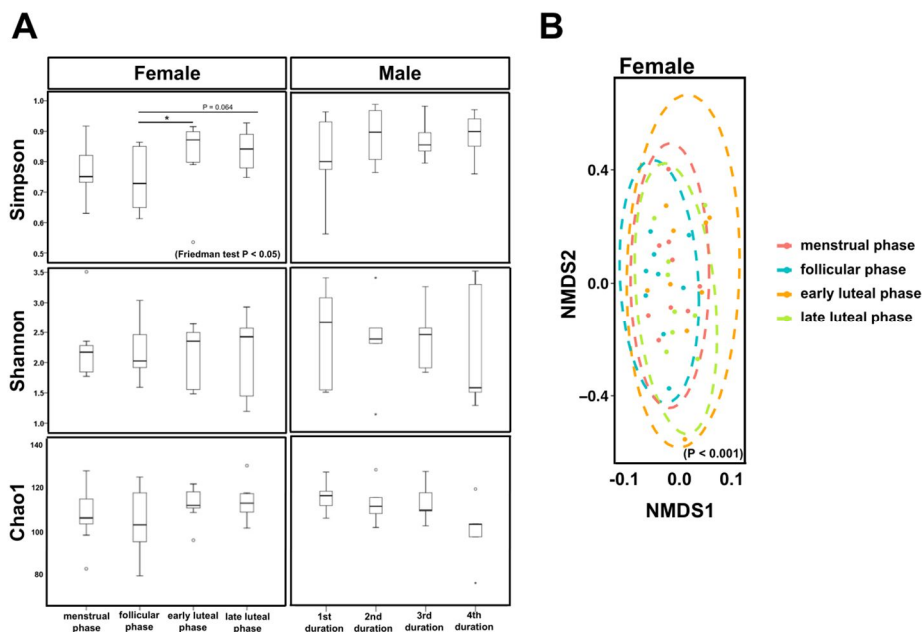


図 3 口腔内細菌叢の多様性

(4) 細菌量

健康成人女性において口腔内細菌叢の上位 20 細菌属の存在比に関して性周期における特徴的な変化が確認された 3 細菌属に関して、相対存在比にコピー数を乗じて菌量を算出した。Streptococcus の細菌量は性周期における統計学的有意差は確認できなかつた (図 4A)。一方、卵胞期における Prevotella 7 の細菌量は月経期の細菌量よりも有意に少なかつた ($P < 0.01$) (図 4B)。また、卵胞期における Prevotella 6 の細菌量は黄体初期の細菌量よりも有意に少なかつた ($p < 0.05$) (図 4C)。

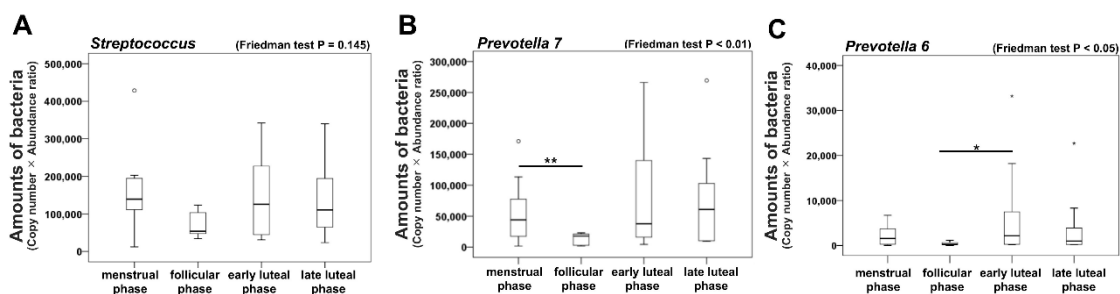


図 4 健康成人女性における各細菌属の存在量

(5) まとめと今後の展望

本研究は、16s rRNA シークエンスにより性周期における特定の細菌属との周期的変化を証明した初めての研究であり、健康成人女性の性周期における特徴的な口腔内細菌叢を示した。特に、Streptococcus 属と Prevotella 属の卵胞期と黄体期 (初期・後期) における相反する変化を明らかにした点が本研究のオリジナリティである。今後は歯肉炎といった口腔内トラブルを自覚する成人女性における性周期の口腔内細菌叢の変化を調査し、口腔内環境と口腔内細菌叢の関係性を明らかにする必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamazaki Ayaka, Ogura Kohei, Minami Kana, Ogai Kazuhiro, Horiguchi Tomomi, Okamoto Shigefumi, Mukai Kanae	4. 巻 13:1119602
2. 論文標題 Oral microbiome changes associated with the menstrual cycle in healthy young adult females	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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） 10.3389/fcimb.2023.1119602	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Shigefumi Okamoto, Kazuhiro Ogai, Kanae Mukai, Junko Sugama	4. 巻 9(8)
2. 論文標題 Association of Skin Microbiome with the Onset and Recurrence of Pressure Injury in Bedridden Elderly People	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9081603.	査読の有無 有
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎綾夏, 向井加奈恵, 小倉康平, 南香奈, 大貝和裕, 岡本成史, 増田和実
2. 発表標題 成人女性の月経周期に伴う口腔細菌叢の変動
3. 学会等名 第35回 日本体力医学会 北陸地方会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山崎綾夏, 小倉康平, 南香奈, 大貝和裕, 岡本成史, 向井加奈恵
2. 発表標題 健康女性の唾液中の性周期依存的なStreptococcusならびにPrevotella属細菌の変動
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎綾夏、小倉康平、南香奈、大貝和裕、岡本成史、向井加奈恵
2. 発表標題 成人女性の月経周期に伴う口腔細菌叢の変化
3. 学会等名 第10回看護理工学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎綾夏、小倉康平、南香奈、大貝和裕、岡本成史、向井加奈恵
2. 発表標題 月経周期に伴う口腔内の Streptococcus ならびに Prevotella 細菌属の変動
3. 学会等名 第59回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室のウェブサイト https://wmn.w3.kanazawa-u.ac.jp/

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	大貝 和裕 (Ogai Kazuhiro) (40706983)	石川県立看護大学・看護学部・教授 (23302)	

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	南 香奈 (Minami Kana) (30819389)	金沢大学・保健学系・助教 (13301)	
研究分担者	堀口 智美 (Horiguchi Tomomi) (40768826)	金沢大学・保健学系・准教授 (13301)	

	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
研究協力者	岡本 成史 (Okamoto Shigefumi)		
研究協力者	小倉 康平 (Ogura Kohei)		

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