

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10475

研究課題名（和文）次世代シーケンサーを用いた戦略的インプラント周囲炎細菌叢遷移

研究課題名（英文）Strategic peri-implantitis microbiota transition using next-generation sequencing

研究代表者

草野 薫（KUSANO, Kaoru）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80382498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、インプラント周囲炎に与える細菌叢の影響を明らかにすべく、インプラント周囲炎細菌叢の経時変化を観察し、効果的な細菌叢遷移法を探索することを目的として実施した。その結果、インプラント周囲炎の症状進行と細菌叢変化データを取得することができた。また、リボフラビンを用いた光線力学療法により細菌叢が大きく変化する条件を明らかにした。本研究が、インプラント周囲炎の難治化予防や症状軽快化へと導く手法開発の一助となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント治療の普及と超高齢社会の到来に伴い、インプラント周囲炎患者に遭遇することが多く、その治療に苦慮することが多い。背景には、インプラント患者の有病化だけでなく、健常者であっても上皮接着が弱いインプラント周囲組織では、天然歯周組織と比較し、容易に細菌が侵入し、炎症が発生しやすい状況が根底にある。本課題で得られた結果を元に細菌叢に応じた治療選択法を確立し、インプラント周囲炎の予防、そして予後診断を確立し、総合的なインプラント周囲炎治療のクライテリアの作成に発展させることが可能となる。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to clarify the influence of the microbiota on peri-implantitis, to observe changes over time in the microbiota of peri-implantitis, and to search for an effective method of transitioning the microbiota. As a result, we were able to obtain data on the progression of peri-implantitis symptoms and changes in the microbiota. In addition, we clarified the conditions under which photodynamic therapy using riboflavin causes significant changes in the oral microbiota. It is expected that this study will contribute to the development of methods to prevent the refractory progression of peri-implantitis and to alleviate its symptoms.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：インプラント周囲炎 細菌叢 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療が確立されてきている今日、いかにインプラントの長期安定性を保った状態にするか、また長期経過の中で様々な合併症に対してどのように対応していくかが大きな課題である。口腔内には1万種を超える多種多様な微生物種の存在が報告されており (Keiser *et al.* 2008), 解性偏性嫌気性グラム陽性桿菌種 (AAGPRs) が、しばしば歯周炎部位から検出されることから、慢性歯周炎の病原菌であると報告されている (Uematsu & Hoshino, 1992)。これらの細菌による複合感染である歯周病やインプラント周囲炎は、歯周炎とインプラント周囲炎の細菌叢は似ているものの、歯周病原細菌がインプラント周囲炎で検出されないこともあると報告され (Koyanagi *et al.* Journal of Oral Microbiology 2010), 歯周病とインプラント周囲炎発症後にはそれぞれ類似した症状を呈するが、歯周病の治療がインプラント周囲炎治療には著効しない場合が多いのは、主に細菌叢の違いが1つの要因として関与しているものと推察される。また、複合感染特有の細菌同士の相互作用や、それらがどのような病原的機能を有するかを検索した上で、インプラント周囲炎治療に望むことが重要となると考える。

インプラント周囲炎の治療の際には、周囲組織の状態、ポケット深さ、プロービング時の出血 (BOP)、排膿の有無およびX線による骨吸収量を観察する必要がある。現在の所、そのクライテリアとしては、Langらが示した、累積的防御療法 (CIST : Cumulative Interceptive Supportive Therapy) を参考にするほか現在には指標がない。これらが提唱する治療法は、機械的清掃、薬剤などによる殺菌的治療、抗菌の治療、切除や再生療法などの外科的療法があげられる。しかし、それらを組み合わせてインプラント周囲炎治療を行うが、患者間あるいはインプラント周囲炎部位や発症環境で、その治療効果が異なっているのが現状である。

近年、次世代シーケンシング技術と呼ばれる、短時間で大量の塩基配列を解読できる技術が開発され、口腔に共生する細菌の菌叢 (細菌構成のバランス) を比較的簡便に解析できるようになった。歯周病やインプラント周囲炎においても、それらの違いについて、観察されており (Shiba *et al.*, 2016) インプラント周囲炎における細菌叢の機能解析や治療法の確立が大きな課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が構築した菌叢構成を維持したまま培養可能な菌叢培養モデルと次世代シーケンシング技術を組み合わせ、各種治療法において、インプラント周囲炎の難治性群と軽快群での細菌叢を検索し、菌叢に応じた効果的な細菌叢遷移を高解像度で解析する。データをもとに戦略的に治療効果の得られる軽快群細菌叢へと遷移させ、インプラント周囲炎軽快群へと「細菌叢を変える」ということによる細菌叢に応じた治療選択法を確立して、インプラント周囲炎の予防、そして予後診断に導くものである。

3. 研究の方法

(1) インプラント周囲炎患者の臨床データおよびサンプル採取

インプラント周囲炎患者の臨床データとして、年齢、性別、既往歴のほかにインプラント埋入部位、インプラントの種類 (表面形状および性状)、上部構造の種類、上部構造の固定法、埋入後の経過年数をデータベース化した。臨床所見として、プラークコントロール (PI) の状態、プロービング時の出血 (BOP)、プロービング深さ (PD)、排膿の有無、X線学的評価による骨吸収量、インプラント周囲の角化付着粘膜の有無をそれぞれ観察した。細菌叢を解析するためにインプラント周囲炎患者の患部より、歯肉縁下プラークを解析サンプルとして採取した。具体的には、糖尿病、リウマチなどの膠原病などの易感染性疾患のない健常な患者を初期サンプル採取対象患者とし、サンプル採取以前3カ月に抗菌薬の服用歴がない事を条件とした。サンプル採取は本学附属病院で行い、インプラント周囲炎罹患部位の歯肉縁上プラークを除去後、滅菌ペーパーポイント (JM ペーパーポイントショート 04 テーパー, モリタ) を用いて、ポケット内に挿入静置し、歯肉縁下プラークを採取した (図1)。



図1 インプラント周囲炎細菌叢の採取

(2) 細菌叢培養モデル

本研究の特徴は、口腔細菌叢変化を、我々が独自に開発した菌叢培養モデル (図2) を用いて解析することにある。具体的には、成人被検者よりフロス (オキナ, 大阪) にてプラークを採取

し,添加物を様々な濃度で溶解した改変 SHI 培地に懸濁した .非接触濁度計(OD-Monitor C&T, タイテック)により培養増殖曲線を作成し,対数増殖期の光学密度が 2 割低下する添加物濃度を算出した .再度,プラークを採取し,リポフラビン等を上記の方法で算出した濃度まで段階的に溶解し,改変 SHI 培地嫌気,あるいは 5% CO2 を含む好気条件で 20 時間振盪培養した (菌叢培養モデル) . 集菌と DNA 抽出の後, 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR 増幅し, 次世代シーケンサーMiSeq (Illumina) にて塩基配列の解読を行った . 配列情報からの OTU table 作成, 多様性解析, 多様性解析などの統計解析は, 本講座で構築している R スクリプトワークフローを使用した . また, 培養前後や添加物曝露の系列毎に, 細胞内 ATP 定量 (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, プロメガ) とコロニー形成単位 (CFU) を計測することで, 総菌増加量の定量解析を行った .

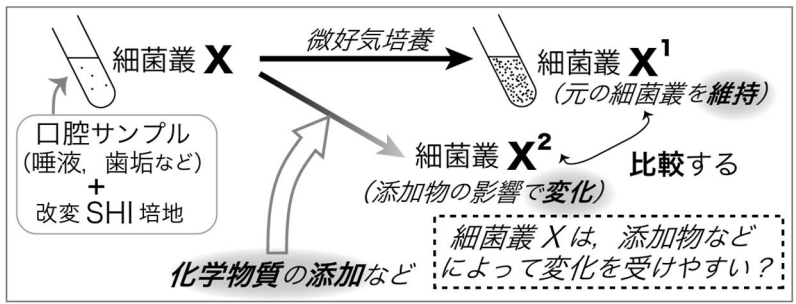


図3 我々が構築した口腔細菌叢培養モデル
 詳細は研究分担者の論文に記載 : Nambu et al. (2019) Microorganisms, 7:353.

4 . 研究成果

(1) 細菌叢採取方法の確立

インプラント周囲炎患者の患部より, 歯肉縁下プラークを解析サンプルとして採取し, 次世代シーケンス解析により患部細菌叢を明らかにする手法を確立した (図 3) . また, 臨床データと細菌叢との相関を明らかにするパイプラインを Python や R 言語で構築した .

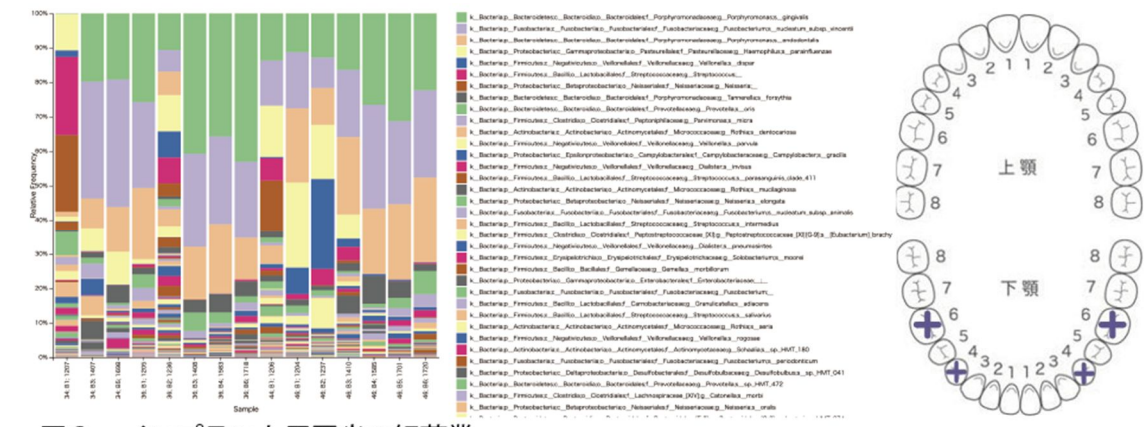


図3 インプラント周囲炎の細菌叢

(2) 細菌叢培養モデルの確立

細菌叢培養モデルは, 接種したプラーク菌叢を維持しつつ培養することで, ヒト介入試験を回避し, 光線力学療法などによる菌叢変化を高解像度で解析できることを確認している . また, 本手法は, 「 数菌種の共培養 」 「 菌叢培養モデル 」 「 ヒト介入試験・コホート研究 」 の様な関係性を持ち, 鍵となる菌種を用いてメカニズムの追求 () が可能となるだけでなく, 実際のヒト試験で介入による菌叢変化を問う () など, 研究を有機的に発展させることが可能となる . 疾患部位の菌叢を変えることを目指したヒト介入研究は, 患者自身にも非常に負担がかかるものであり, 大量の条件をテストするのは現実的ではない . そこで我々は, そのような諸問題を解決した上で菌叢遷移を可能とする方法を検討し, 採取したプラークなどの口腔サンプル菌叢を維持しつつ培養できる菌叢培養モデルを構築するに至った (図 2)

(3) インプラント周囲炎細菌叢の経時的変化

細菌叢解析手法の確立により, インプラント周囲炎患者間の細菌叢を比較する横方向の解析だけでなく, 同一患者 (同一部位) の経時的細菌叢変化を追う縦方向の解析も可能となった . 現在までに, 16 部位のインプラント周囲炎細菌叢, 並びに健康部位, 歯周病部位の細菌叢変化を追跡している . 解析途中ではあるが, 特定の口腔細菌の増減等を検出しており (図 4 , 5), 臨床データを踏まえた 多様性変化を解析している . 結果がまとめ次第, , 学術論文として公表予定である .

Porphyromonas gingivaris

Fusobacterium nucleatum

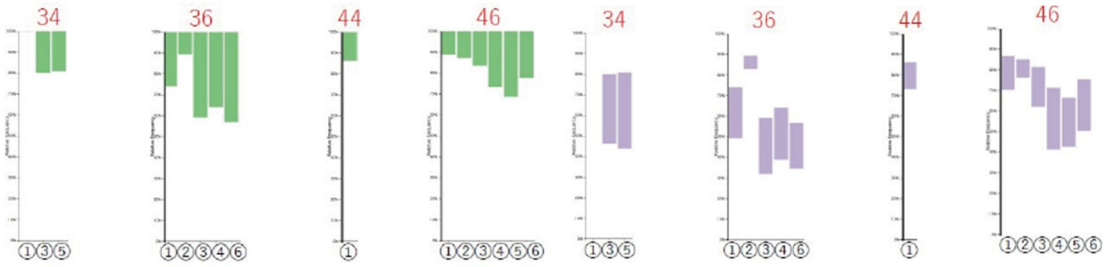


図4 インプラント周囲炎細菌叢の経時変化（一部）

（４）リボフラビンを用いた光線力学療法

細菌培養モデルを用いて、近年注目を集めつつあるリボフラビンを用いた光線力学療法により、口腔細菌叢がどのように変化するのかを解析した。その結果、リボフラビン濃度を固定し、青色 LED の照射出力を上げるにつれて、口腔細菌叢が変化していくことが明らかとなった(図6)。現在、複数の被検者からのサンプルを用いて実験を行っており、結果がまとまり次第、学術論文として公表予定である。

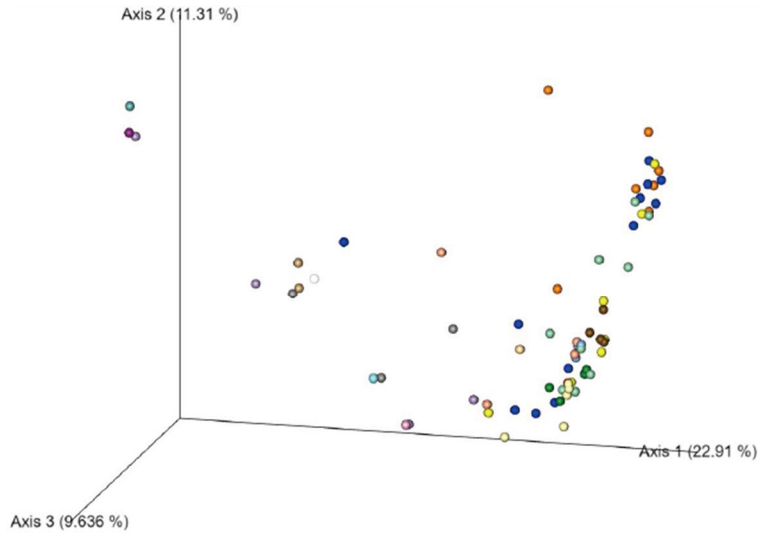


図5 インプラント周囲炎細菌叢の経時変化（β多様性）

（５）本研究の将来構想

本研究により、インプラント周囲炎の患部状態変化に伴った細菌叢変化の一端が明らかになりつつある。また、リボフラビンを用いた光線力学療法により、口腔細菌叢を変化させることができることが実証できた。今後、本解析を続けていくことで、インプラント周囲炎の難治化予防や症状の軽快へと導く手法開発の一助となると期待される。



図6 光照射による菌叢変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Komuro Akira, Yamada Yoichi, Uesugi Satoshi, Terashima Hiroaki, Kimura Masashi, Kishimoto Hiroto, Iida Tsutomu, Sakamoto Katsuya, Okuda Kenichi, Kusano Kaoru, Baba Shunsuke, Sakamoto Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Accuracy and dimensional reproducibility by model scanning, intraoral scanning, and CBCT imaging for digital implant dentistry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Implant Dentistry	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40729-021-00343-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Enomoto A, Nambu T, Kashiwagi K, Okinaga T, Baba S.	4. 巻 54
2. 論文標題 Impact of short term saliva storage at room temperature on the microbial composition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 73-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.54.1_73	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama H, Masago A, Nambu T, Mashimo C, Takahashi K, Okinaga T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Inter-site and interpersonal diversity of salivary and tongue microbiomes, and the effect of oral care tablets.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 F1000Res	6. 最初と最後の頁 1477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12688/f1000research.27502.1	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 Enomoto A, Nambu T, Kashiwagi K, Okinaga T, Baba S	4. 巻 54
2. 論文標題 Impact of short-term saliva storage at room temperature on the microbial composition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	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） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村井亜希子, 奥 佳葉, 小林信博, 谷岡款相, 山田陽一, 上野美奈, 草野 薫, 馬場俊輔
2. 発表標題 当院におけるJS01インプラント専門歯科衛生士としての役割
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草野 薫
2. 発表標題 バイオマテリアルによる骨移植の現状～既承認材料で骨はどこまでできるのか？～
3. 学会等名 近未来オステオインプラント学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎本温子, 南部隆之, 柏木宏介, 沖永敏則, 馬場俊輔
2. 発表標題 唾液の室温での短期保存による微生物組成への影響
3. 学会等名 日本細菌学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南部隆之
2. 発表標題 口腔細菌パターンを“健康型”へと変える試み
3. 学会等名 日本歯科保存学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	山田 陽一 (YAMADA Yoichi) (20345903)	岐阜大学・医学部・教授 (13701)	
研究 分担者	馬場 俊輔 (BABA Shunsuke) (40275227)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	
研究 分担者	南部 隆之 (NAMBU Takayuki) (80367903)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

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
---------	---------