

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19322

研究課題名（和文）インプラント周囲炎の病態把握に有用な新しい簡易細菌検査法の確立

研究課題名（英文）Establishment of the bacteriological test method that is useful for the determination of peri-implantitis onset risk.

研究代表者

内堀 聡史（UCHIBORI, Satoshi）

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：90706508

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年インプラント周囲炎患者のインプラント周囲の細菌を調査した研究において、*Slackia exigua* (S.ex) という細菌が最も優勢であると報告されている。このことからS.exをインプラント周囲炎の病的バイオマーカーと捉え、臨床の現場で有用なインプラント周囲炎の病態把握に有用な検査キットの開発を行った。

インプラント周囲炎患者、および健常者のインプラント周囲溝滲出液を採取し開発した検査キットを用いたところ、S.exの菌数を定量可能であることが確認された。本検査キットは、臨床においてインプラント周囲組織状態を把握することが可能であり、診断・治療・予後の判定に活用できると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、臨床で行われているインプラント周囲炎に関する細菌検査のターゲットとなる細菌は、歯周炎と関連した細菌の有無や菌量を調べるものが主流であるが、実際のインプラント周囲組織状態と一致しない場合も多く臨床的意義に疑問を持つ声もある。近年の研究報告ではインプラント周囲炎と歯周炎で炎症惹起の主因となる細菌叢の相違が示唆されている。そこで申請者は、*Slackia exigua* という細菌がインプラント周囲炎罹患患者のインプラント周囲溝内で最も優勢であった過去の研究結果を踏まえ、本菌をインプラント周囲炎の病的バイオマーカーとして捉えることを着想した。

研究成果の概要（英文）：Recently, in the study that investigated the bacteria around the implant of peri-implantitis patients, some studies reported that *Slackia exigua* (S.ex) dominated in peri-implant sulcus fluids (PSFs). The aim of this study was to development of the clinical kit for the assessment of S.ex level as clinical indicator in peri-implantitis.

A clinical kit was developed using the selective medium made from an improved composition. For, examination of clinical efficacy, PSFs samples were collected from peri-implantitis patients and healthy patients with implants. The result obtained by using developed kit was compared with that of selective agar. The growth of oral bacteria other than S. ex was markedly in this clinical kit. Since this clinical kit can accurately estimate the level of S. ex in PSFs samples, it suggested that monitoring S. ex level is useful as a clinical indicator for evaluation of peri-implant tissue condition.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：インプラント周囲炎 細菌 検査法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲炎起因細菌は、歯周病と同様に *Porphyromonas gingivalis* を代表とする Red Complex 細菌が主体であると考えられてきた。しかし近年、インプラント周囲炎罹患者のインプラント周囲溝内細菌叢をメタゲノム解析によって詳細に調査した研究によると、グラム陽性菌である *Slackia exigua* (*S. exigua*) が最も優勢な細菌であったと報告している(引用文献)。申請者は以前から本菌に着目し、同定法および選択培地を用いた分離法を確立しており、インプラント周囲炎非罹患者と比較してインプラント周囲炎罹患者のインプラント周囲溝に *S. exigua* が有意に多く検出されたことを既に報告している(図1・引用文献)。これは理想的な健常細菌叢バランスを崩した結果、本菌がインプラント周囲炎罹患者のインプラント周囲溝細菌叢で相対的に増加したと考えられ、総菌に占める本菌の割合を調査することは、インプラント周囲溝内細菌叢の良否をはかる指標になると考えられる。

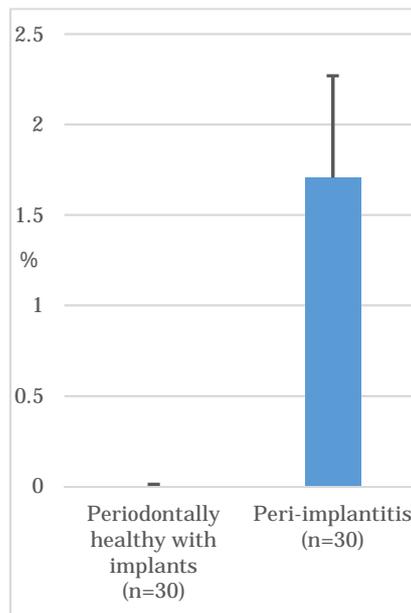


図1

2. 研究の目的

そこで申請者は、インプラント周囲炎罹患者のインプラント周囲溝細菌叢で優勢ある本細菌をインプラント周囲炎に対する病的バイオマーカーとして捉え、培養法を応用した半定量試験による簡易で安価かつ検出感度が高く、非侵襲的に得られる口腔試料を用いたインプラント周囲炎の病態把握に有用な検査キットを開発することを目的とした。これにより単に学術的意義だけではなく、エビデンスに裏付けされた臨床応用が可能となり、歯科治療における質の向上と補助に寄与するものと思われる。さらに、インプラント周囲炎のリスク判定、リコール間隔の決定、およびインプラント周囲炎消炎処置後の予後判定に応用可能であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 本研究ではインプラント周囲炎病的マーカーを定量可能な検査キットの開発を試みた。検査キットは、pH 指示薬に色調変化により判定するために、以前開発した *S. exigua* 選択培地の組成を改良して行った(引用文献)。 *S. exigua* は培地中に含まれているアルギニン分解することによりアンモニアを産生し、pH が上昇することに着目して、改良した培地の組成に pH 指示薬であるフェノールレッド (PR) を添加した選択培地を作製した。改良型 *S. exigua* 選択培地および総菌用培地として 10% 馬血清添加 CDC 寒天培地に *S. exigua* 菌液を接種・塗抹後、37℃、5 日間嫌気培養を行い、*S. exigua* の回収率を算定した。

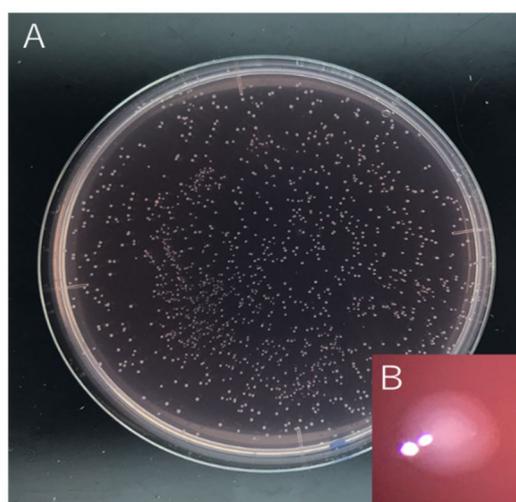


図2 改良した *S. exigua* 分離用選培地
A. PISFs 試料接種，培養 5 日後
B. *S. exigua* コロニー拡大像

(2) 細胞培養用 24well プレートに改良型 *S. exigua* 選択培地 4ml 分注したものを検査キットの試作品とした。10 倍段階希釈した標準株 *S. exigua* JCM 11022 および分離株 *S. exigua* NUM-Sex 6965 懸濁液を検査キットにそれぞれ 10 μ l 接種し、37、5 日間嫌気培養後、PR による色調変化により、菌数を設定したカラーチャートを作成後、基準値の設定を試みた。

(3) 本研究は、ヒトから採取したインプラント周囲溝浸出液(PISFs)を用いるため、日本大学松戸歯学部倫理審査委員会に本研究の申請を行い、承認を得ている(承認番号 EC17-014)。なお、本研究で対象となる被験者は試料採取時に 2 ヶ月間抗菌薬の服用がない者とした。インプラント周囲炎罹患者 30 名および非罹患者 30 名を対象者とし、インプラント周囲溝内にペーパーポイントを 10 秒間挿入し PISF を採取し、本キットに接種した(表 1, 図 3)。改良型 *S. exigua* 選択培地および本キットを用いて本菌の定量的検出を行うとともに、改良した選択平板培地による検出結果と比較検討を行うことにより、本検査キットの有用性を調査した。菌種同定は本研究で設計した *S. exigua* 特異的プライマーを用いた PCR 法にて行った(表 2)。統計的分析は Kruskal-Wallis ANOVA を用いた。

表 1 対象者と臨床所見

Subject	Sex	Age	Probing depth (mm)
Healthy implants (n=30)	male 12	52.3 (rage: 25-78)	1.7 (range: 1-4)
	female 18		
Peri-implantitis (n=30)	male 16	63.9 (rage: 46-90)	6.5 (range: 5-11)
	female 14		



PISFs were collected using endodontic paper points.



Samples were placed on clinical kits.

図 3 採取方法

表 2 使用した PCR プライマー

Bacteria species	Sequence
<i>S. exigua</i>	TTTAGGGGGCGCATAGAGT AAGGGATTTCGCTCGCCCTCGCGGGTC

インプラント周囲炎の病態把握に有用な検査キットで用いた培地組成

Tryptic soy agar, Yeast, Hemin, Vitamin K1, L-cysteine, Serum horse, Arginine, Phenol red, Trimethoprim, Nalidixic acid, Polymyxin B, Oxacillin, Phosphomycin, Amphotericin B

(4) インプラント周囲炎に対する病的バイオマーカー菌である *S. exigua* のアルギニン濃度による発育の違いを調査するために、Tryptic soy broth 半流動培地にアルギニンを 0%, 0.02%, 0.2% および 2.0% 添加したものを試験管に分注し、*S. exigua* 菌液を白金線にて空気が入らないように手早く接種し、37、4 日間、好気培養を行った。培養後、試験管内でのそれぞれの発育の違いを比較検討した。

4. 研究成果

(1) 改良型 *S. exigua* 選択平板培地において、*S. exigua* は良好な回収率を得ることができた(表 3)。選択性は従来の *S. exigua* 選択平板培地を改良することで目的外菌は抑制され、本検査キットに PR による色調変化によって標準株 *S. exigua* JCM11022、および分離株 NUM-Sex6965 の菌数を正確に定量可能であることが確認された(図 4)。

表 3 改良型 *S. exigua* 選択平板培地における *S. exigua* の回収率

Strain		CDC-10%Serum horse CFU/ml, $\times 10^9$	Modified-SexSM CFU/ml, $\times 10^9$	Recovery, %
<i>S. exigua</i>	JCM 11022	1.6 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	93.8
	NUM-Sex 6965	1.4 \pm 0.3	1.2 \pm 0.2	85.7

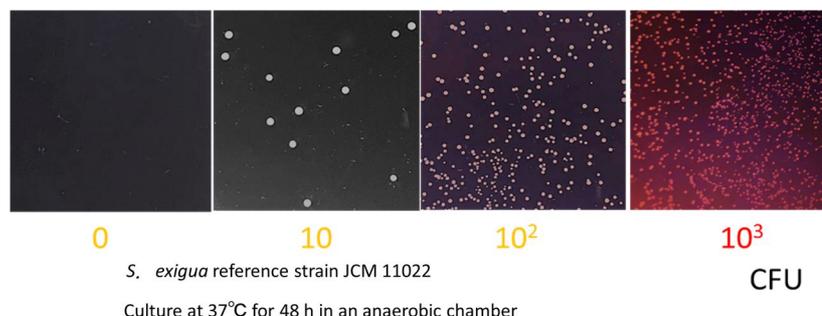


図 4 検査キットにおける PR による色調変化

(2)インプラント周囲炎罹患患者および非罹患患者における *S. exigua* 数は、平均 3.2×10^4 (range: 4.4×10^3 - 8.8×10^4) と平均 5.3×10 (range: 0 - 2.9×10^2) であり、インプラント周囲炎罹患患者に *S. exigua* が有意に多く認められた(表 4)。また、検査キットの PR による色調変化によって、*S. exigua* 数を定量することが可能であった。さらに、検査キットにおける *S. exigua* 検出菌数と選択培地による *S. exigua* の菌数に相関が認められたことから、正確な菌数定量が可能であると判断された。以上のことから、本菌はインプラント周囲組織状態が病的状態へとシフトするのを察知可能な biosensor として最適なバイオマーカーと考えられ、*S. exigua* に着目した本検査キットは、臨床においてインプラント周囲組織状態を正確にモニタリングすることが可能であり、診断・治療・予後の判定に活用できると推察された。

	Healthy implants (n=30)	Peri-implantitis (n=30)
CFU of <i>S. exigua</i> by using modified-SexSM	5.3×10 (range: 0 - 2.9×10^2)	3.2×10^4 (range: 4.4×10^3 - 8.8×10^4)
No. of positive samples* by using clinical kit	0	30

* The samples which changed from red to yellow by alkali production from arginine, after the cultivation for 48 h in an anaerobic chamber, were defined as positive.

表 4 開発した検査キットの臨床評価

(3) Tryptic soy broth 半流動培地を用いて, *S. exigua* のアルギニン濃度による発育の違いを調査した結果を図 5 に示す。*S. exigua* の発育能はアルギニン濃度依存的に増加する傾向を示した。また, 酸素濃度が低い培地下層部までの発育が認められた。寺井によると浅い歯周ポケットの歯肉溝滲出液中のアルギニン濃度は約 0.16%であったのに対し, 深い歯周ポケットでは 3.43%であったと報告している(引用文献)。故に, 高いアルギニン環境と低い酸素濃度が維持されている慢性歯周炎における深い歯周ポケットやインプラント周囲炎における深い周囲溝では, *S. exigua* が発育する環境として適していることが示唆された。



Arginine, % 0.02 0.2 2.0

図 5 *S. exigua* のアルギニン濃度における発育の違い

引用文献

Takahiko Shiba, Takayasu Watanabe, et al., Sci Rep. 2016;6:30997.doi: 10.1038/srep30997.

Taira Kobayashi, Satoshi Uchibori et al., J Dents Dent Med,2018;1(3),1-7.

寺井 浩, 日野 出 大 輔, 他. 口腔衛生学会雑誌 1996; 41, 301-306.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 内堀聡史, 續橋 治, 上里ちひろ, 高橋佑次, 玉木大之, 小峯千明, 淵上真奈, 深津 晶, 小林 平, 村上 洋, 福本雅彦	4. 巻 12
2. 論文標題 歯周組織の健常マーカーの指標となり得る細菌の検索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会誌	6. 最初と最後の頁 3-10
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 -
1. 著者名 淵上真奈, 續橋 治, 内堀聡史, 高橋佑次, 深津 晶, 小峯千明, 小西賀美, 小倉由希, 大森寛子, 若井広明, 小野喜徳, 玉木大之, 小林 平, 村上 洋, 福本雅彦	4. 巻 13
2. 論文標題 Multiplex PCR 法を用いた口腔 Eubacterium属とインプラント周囲炎との関連性の調査	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会誌	6. 最初と最後の頁 53-60
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 -
1. 著者名 小林 平, 内堀聡史, 續橋 治, 高橋佑次, 上里ちひろ, 玉木大之, 淵上真奈, 村上 洋, 深津 晶, 福本雅彦	4. 巻 13
2. 論文標題 疾患特異的バイオマーカーに着目した糖尿病スクリーニング検査キットの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 45-52
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 -
1. 著者名 Taira Kobayashi, Satoshi Uchibori, Osamu tsuzukibashi, Chihiro Uezato, Mana Fuchigami, Yuji Takahashi, Hiroyuki Tamaki, Koji Umezawa, Takaaki Tanaka	4. 巻 3
2. 論文標題 Multiplex PCR for simultaneous detection and identification of six Slackia speices including Slackia exigua involved in peri-implantitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dentistry and Dental Medicine	6. 最初と最後の頁 1-5
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 -

1. 著者名 續橋 治, 内堀聡史, 淵上真奈, 上里ちひろ, 小峯千明, 高橋佑次, 小西賀美, 小野良徳, 深津 晶, 福本雅彦	4. 巻 12
2. 論文標題 Aggregatibacter actinomycetemcomitans簡易検査キットの開発と臨床応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 39-45
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋佑次, 内堀聡史, 上里ちひろ, 井下田繁子, 田中孝明, 二木由峰, 村上 洋, 小林 平
2. 発表標題 Eubacterium属に着目したインプラント周囲炎のリスク判定に有用な客観的評価法の確立
3. 学会等名 第49回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上里ちひろ, 内堀聡史, 田中孝明, 後藤治彦, 北川剛至, 小林 平, 續橋 治
2. 発表標題 インプラント周囲炎で優勢なEubacterium属のMultiplexPCR法
3. 学会等名 日本補綴歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内堀聡史, 上里ちひろ, 田中孝明, 後藤治彦, 村上 洋, 小林 平, 續橋 治
2. 発表標題 最終補綴装置の作製時期決定に有用な細菌検査法の確立
3. 学会等名 日本補綴歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋佑次, 内堀聡史, 續橋 治, 淵上真奈, 井下田繁子, 深津 晶, 小林 平, 村上 洋, 福本雅彦
2. 発表標題 インプラント周囲炎の病態推察に有用な新しい簡易細菌検査キットの開発
3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会第30回日本口腔内科学会第13回日本口腔検査学会合同学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内堀聡史, 高橋佑次, 續橋 治, 深津 晶, 上里ちひろ, 淵上真奈, 井下田繁子, 玉木大之, 村上 洋, 小林 平, 福本雅彦
2. 発表標題 疾患特異的バイオマーカーに着目した糖尿病スクリーニング検査キットの開発
3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会第30回日本口腔内科学会第13回日本口腔検査学会合同学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木秀紀, 續橋治, 淵上真奈, 内堀聡史, 高橋佑次, 小峯千明, 小西賀美, 小倉由希, 大森寛子, 小野喜徳, 浅賀勝寛, 村上 洋, 深津晶, 福本雅彦
2. 発表標題 Rothia aerialはインプラント周囲炎のリスク判定に有用な健常マーカーとなり得る
3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会第30回日本口腔内科学会第13回日本口腔検査学会合同学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内堀 聡史, 高橋 佑次, 上里 ちひろ, 加藤 由佳子, 北川 剛至, 田中 孝明, 村上 洋, 小林 平
2. 発表標題 インプラント周囲炎のリスク判定に有用な新しい簡易細菌検査法の確立
3. 学会等名 第50回公益社団法人 日本口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋佑次, 内堀聡史, 上里ちひろ, 玉木大之, 井下田 繁子, 田中 孝明, 小林 平, 村上 洋
2. 発表標題 Corynebacterium durumはインプラント周囲炎の増悪に関する
3. 学会等名 第50回公益社団法人 日本口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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