

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21792110

研究課題名（和文） 分子生物学的手法によるインプラント周囲炎関連バイオフィルムの総合的解析

研究課題名（英文） Molecular biological approaches to analyzing peri-implant associated biofilms

研究代表者

竹内 康雄（TAKEUCHI YASUO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60396968

研究成果の概要（和文）：インプラント周囲炎は歯周炎と類似した臨床症状を呈するが、本研究の結果、その原因となる細菌叢の構成は2つの疾患で異なることが明らかになった。歯周病に関連が深いとされる歯周病原細菌の検出率は、インプラント周囲炎部位では必ずしも高くなく、一方で *Dialister* spp.、*Eubacterium* spp.、*Peptostreptococcus* spp. は高い割合で検出された。インプラント周囲炎を治療する上での細菌学的な治療のターゲットは歯周病のそれとは違う可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Clinical symptoms of peri-implantitis are similar to that of periodontitis, however, present study revealed that the composition of microbiota occasionally differ between peri-implantitis and periodontitis sites. Detection frequencies of periodontopathic bacteria were not high, while the genera *Dialister* spp., *Eubacterium* spp. and *Peptostreptococcus* spp. showed high prevalence and proportion at peri-implantitis sites. Bacteriological targets for treating peri-implant disease might differ with that of periodontitis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1400000	420000	1820000
2010年度	700000	210000	910000
2011年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
総計	2900000	870000	3770000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：インプラント周囲炎、歯周病原細菌、クローンライブラリー法、機能水

## 1. 研究開始当初の背景

近年欠損歯の補綴方法として、歯科インプラント治療の適応例が増えている一方で、インプラントに関するトラブルも増加している。インプラント周囲炎は、オッセオインテグレーションを獲得したインプラント周囲

におこる炎症性病変であり、歯周炎と類似した病態をとることが知られている。本疾患の原因として、これまでに歯周病原細菌の関与が多く報告されてきたが、一方で、本来は歯周炎との関わりがないとされている腸内細菌や真菌なども同部に認められたとする報

告もある。また現在、インプラント周囲炎の治療は、歯周治療に準じて機械的清掃や抗菌剤の投与が行われているが、これらの方法は必ずしも確立されているわけではない。本疾患の予防や治療を考えた時、病原因子である細菌叢の特徴を明らかにすることは意義のあることと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) インプラント周囲炎・歯周炎・健常歯における歯肉縁下細菌構成を比較し、インプラント周囲炎における細菌学的病原因子について検討する。

(2) 細菌バイオフィルムを破壊する効果が期待される弱アルカリ性の次亜塩素酸電解水がインプラント周囲炎の治療に応用可能であるかどうか、その抗菌性および安全性を *in vitro* で検討し、さらに臨床応用してその効果を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) インプラント周囲炎細菌叢の解析

被験者は同一口腔内にインプラント周囲炎罹患部位、歯周炎罹患部位、健常インプラント部位を有する6名とした。採取予定部位において、臨床的評価〔Probing pocket depth (PPD)、Breeding on Probing (BOP)、Suppuration (SUP)、Gingival Index (GI)〕およびX線像による評価を行った。インプラント周囲炎はPPDが5 mm以上で、BOPもしくはSUPを伴い、X線像でインプラント長径の半分以上、もしくは3スレッド以上の骨吸収が存在するもの、健常インプラントはPPDが4 mm未満で、BOP、SUP両方、また、X線像で骨吸収を伴わないもの、歯周炎に関してはPPDが4 mmより大きく、BOPを伴うものとそれぞれ定義した。

サンプル採取部位の歯肉縁上プラークはキュレットスケーラーと綿球により注意深く取り除いた。その後、ペーパーポイント3本をポケット最深部まで挿入し、30秒静置したものを回収することで歯肉縁下プラークサンプルを採取した。インプラント周囲炎罹患部位および歯周炎罹患部位はすべての被験者より、また健常インプラント部位は3名の被験者から採取した。ペーパーポイントを緩衝液に入れ、攪拌して懸濁液を作製した後、市販のキットを用いて細菌DNAを抽出後、PCR法により細菌の16S rRNA遺伝子の増幅を行った。

当初の予定ではT-RFLP法により細菌叢の解析を行う予定であったが、より詳細に比較検討を行うことを目的として、16S rRNA gene clone library法を用いて解析を行うこととした。すなわち、作製されたPCR産物を精製し、ライゲーションを行った後、*E. coli* にプラスミドを導入し、細菌を培養しプラスミド抽出を行ったものを用いて遺伝子解析を行った。全塩基配列よりBLAST検索をかけ、既存の菌種との相同性を評価した。塩基配列が99%以上一致しているものを同一細菌とし、各部位における細菌構成を調べた。

### (2) 次亜塩素酸電解水の歯周病原細菌に対する効果

*P. gingivalis* ATCC 33277 および *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 を Hemin 5 µg/ml と Vitamin K1 0.1 µg/ml を添加した BHI broth により 24 時間培養したものを、 $1 \times 10^8$  CFU/ml になるよう希釈調製した。次亜塩素酸電解水 (HEW: pH 7.5~8.0) を専用の装置を用いて生成し、菌液 0.1ml に対し 9.9ml の HEW (有効塩素濃度 600・300・150ppm) を 10 秒間作用させた。対照として滅菌生理食塩水、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (NaOCl: 0.06、0.03、0.015%)、クlorルヘキシジン溶液 (CHX: 0.06、0.03、0.015%) についても同様に作用させた。その後、溶液を段階希釈し、ブルセラ血液寒天培地または TSBV 寒天培地に播種した。37 °C で 72 時間培養後、コロニー数を計測し生菌数を算出した。

### (3) 次亜塩素酸電解水のヒト由来細胞に与える影響

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF-1) を 10% FBS・1% penicillin/streptomycin 含有 DMEM にて培養し、 $5 \times 10^4$  cells/ml になるよう細胞懸濁液を調製した。またヒト単核細胞 (THP-1) を RPMI-1640 (10% FBS、1% penicillin/streptomycin 含) にて培養し、 $1 \times 10^5$  cells/ml になるよう細胞懸濁液を調製した。24 時間培養後、PBS で 3 回 wash し、各細胞に HEW (有効塩素濃度 600・60・6ppm) を加え、60 秒間作用させた。対照として滅菌生理食塩水、CHX、NaOCl についても同様に行った。作用後、PBS で 3 回洗浄した後、各細胞をそれぞれ DMEM、また RPMI-1640 で培養し、37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% Air 条件下で培養した。1・24 時間培養後、MTT アッセイにより細胞生存率を算出することで、HEW の細胞毒性について検討した。

また、細胞の増殖・遊走能をみるため wound healing test を行った。培養皿上に均一になるように播種した HGF-1 細胞に間隙を作り、

これに HEW を 60 秒間作用させた後、培養し、間隙を細胞が埋めていく過程を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) インプラント周囲炎細菌叢の解析

インプラント周囲炎部位および歯周炎部位からは、計799クローン、333種類の細菌が検出された。このうち231種(69%)が培養困難な細菌で、データベースに登録されていない新種の細菌も75種含まれていた。部位別にみると、インプラント周囲炎では192種類、歯周炎罹患歯では148種類がそれぞれ同定された(健常インプラントでは12種)。Shannon indexとCao 1 valueより、インプラント周囲炎群では歯周炎と比較して、より複雑で多様な細菌叢が形成されていることが明らかになった。

門レベルでみると、インプラント周囲炎・歯周炎いずれにおいても、*Firmicutes*および*Bacteroidetes*に属する菌が主であった。*Chloroflexi*や*Deferribacteres*はインプラント周囲炎部位にのみ認められた。属レベルでみると、*Fusobacterium* spp.や*Streptococcus* spp.はインプラント周囲炎・歯周炎でともに、高頻度に多くの菌種が検出されていた。一方、歯周炎と比較してインプラント周囲炎で高頻度に認められたものは、*Dialister* spp.、*Eubacterium* spp.、*Porphyromonas* spp.であった。また、*Peptostreptococcus* spp.は検出頻度こそインプラント周囲炎と歯周炎で共に高いものの、インプラント周囲炎で認められる場合には、*Parvimonas micra*や*Peptostreptococcus stomatis*のクローン数が歯周炎で認められる場合と比較して高い傾向が認められた。また、インプラント周囲炎における*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*といった歯周病原細菌の検出率は33~66%であった。我々が以前、歯周炎患者を調べた際、その検出率は全ての菌種で80%以上であり、それと比較すると検出率は低いといえた。

本研究のように、インプラント周囲炎で認められる細菌構成を網羅的に調査した報告はこれまでにない。過去の研究の多くは特定の細菌、なかでも歯周病原細菌を中心に調べられたものがほとんどである。インプラント周囲では埋入後2週間である程度確立された細菌叢を構成することが報告されており、これらの細菌は主に同一口腔内の残存歯周囲や粘膜等に由来すると考えられている。従って、同一口腔内のサンプルであれば、インプラント周囲炎と歯周炎で同様の細菌構成が認めら

れるのではないかと当初予想していた。しかし、本研究ではサンプル数に限りがあるものの、明らかにインプラント周囲炎では歯周炎と比較しより多くの種類の細菌から細菌叢が構成されており、歯周病原細菌の検出率も決して高いものではないことがわかった。この細菌構成の差違については、インプラントと歯の表面の性状の違いなどが影響していると考えられるが、不明な点が多い。また、インプラント周囲炎にのみ特徴的に検出される細菌や、その数が増えている細菌が存在していたが、これらの細菌がインプラント周囲炎の病原性に真に関わっているのかどうかについて、今後検討を加えてゆく予定である。

##### (2) 次亜塩素酸電解水の歯周病原細菌に対する効果

次亜塩素酸電解水(HEW)を作用させると、*P. gingivalis*と*A. actinomycetemcomitans*の生菌数に有意な減少が認められた。特に*P. gingivalis*に対しては、今回計測した最も低い有効塩素濃度である150ppmのものでも、滅菌生理食塩水を加えた場合と比較して、有意に*P. gingivalis*の生菌数が少なかった。細菌種によりその感受性に違いはあるものの、次亜塩素酸電解水は歯周病原細菌に対し短い接触時間であっても抗菌作用を示した。その効果は代表的な消毒薬である次亜塩素酸ナトリウム溶液やクロルヘキシジン溶液をHEWと同程度の濃度で作用させた場合と同じ程度であると考えられた。

##### (3) 次亜塩素酸電解水のヒト由来細胞に与える影響

HGF-1に有効塩素濃度が600および60ppmのHEWを作用させた場合、その生存細胞数は滅菌生理食塩水を加えた場合と比較して有意に低かった。同様の傾向は次亜塩素酸ナトリウム溶液やクロルヘキシジン溶液を作用させた場合においても認められた。一方、THP-1に用いた場合、600ppmのHEWを作用させた時は生存細胞数に減少が認められたが、60ppmのものでは変化が認められなかった。しかし、同程度の濃度である0.006%のCHXやNaOClを作用させた場合には細胞数の減少が認められた。この結果をみる限り、次亜塩素酸電解水の宿主細胞に与える傷害性は、次亜塩素酸ナトリウム溶液やクロルヘキシジン溶液と同程度か、より低いものと予想された。

Wound healing testでは、有効塩素濃度が30ppmのHEWで刺激後に培養を継続した場合、24時間後で約30~40%、48時間後で40~50%の回復率を示した。一方で、60ppmのHEWで

は添加直後に細胞の形態に萎縮が観察され、その後培養を続けても間隙の閉鎖は認められなかった。NaOCl や CHX の濃度をこれに合わせて同様の実験を行った場合にも、同じように治癒不全・治癒遅延が認められたため、傷害性の程度は同程度と考えている。

次亜塩素酸電解水は、現在用いられている消毒液と同程度の抗菌作用を示すことが明らかとなった。機能水は耐性菌を作る可能性がきわめて低く、安全性が高いと考えられている。一方で、実験デザインの影響はあるものの、本研究では、次亜塩素酸電解水は抗菌作用を示すよりも低い濃度で細胞傷害性が認められたことも事実である。電解水を口腔内に応用することを考えた場合、安全性を確保した上での適切な使用法を考える必要がある。口腔内には唾液や歯肉溝滲出液が存在し、また出血などが認められれば、それらにより電解水は希釈され、そこに含まれる有機質の影響で殺菌能が低下することが考えられる。また細菌はバイオフィルムを形成し自らを守っているが、抗菌効果を期待するあまり有効塩素濃度を上げすぎれば歯周組織への傷害性が問題となる。今回使用した電解水の生成装置は薬事法の承認を受けたものではなかったこともあり、安全性を確保する立場から臨床研究については断念せざるを得なかった。

## 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2件)

竹内康雄、和泉雄一、中性 s 電解機能水の歯周治療への応用、日本歯科理工学会雑誌、査読有、vol.30、No.2、2011、pp.13-16  
Koyanagi T、Sakamoto M、Takeuchi Y、Ohkuma M、Izumi Y、Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library、J Oral Microbiol、査読有、vol.2、2010、5104

[学会発表](計8件)

宗像源博、作山葵、立川敬子、竹内康雄、石渡正浩、和泉雄一、春日井 昇平、インプラント周囲炎を生じた患者に対する細菌学的検討、第 54 回日本歯周病学会春季学術大会、平成 23 年 5 月 28 日、福岡  
小柳達郎、坂本光央、竹内康雄、丸山緑子、大熊盛也、和泉 雄一、16S rRNA gene clone library 法を用いたインプラント周囲炎細

菌叢の解析、第 54 回日本歯周病学会春季学術大会、平成 23 年 5 月 28 日、福岡  
小柳達郎、竹内康雄、丸山緑子、小田茂、和泉 雄一、16S rRNA gene clone library 法を用いたインプラント周囲炎細菌叢の解析、日本口腔インプラント学会 第 30 回関東甲信越支部学術大会、平成 23 年 2 月 13 日、横浜

Koyanagi T、Sakamoto M、Takeuchi Y、Ohkuma M、Izumi Y、Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library、World Congress on Oral Implantology、平成 22 年 11 月 20 日、インド国デリー

Koyanagi T、Sakamoto M、Takeuchi Y、Ohkuma M、Izumi Y、Analysis of the microbiota associated with peri-implantitis、International Association of Dental Research General Session、平成 22 年 7 月 16 日、スペイン国バルセロナ

竹内康雄、中性機能電解水の歯周・う蝕治療への活用の可能性、第 132 回日本歯科保存学会春期学術大会、平成 22 年 6 月 5 日、熊本

[図書](計4件)

小柳達郎、竹内康雄、和泉雄一、デンタルダイヤモンド社、インプラント時代の歯周マネジメント、歯周病原細菌とインプラント周囲炎の原因菌の比較、2011、pp.63

小柳達郎、竹内康雄、和泉雄一、永末書店、新インプラント周囲炎へのアプローチ、インプラント周囲の細菌叢、2010、pp.17-19  
小柳達郎、竹内康雄、和泉雄一、医学情報社、インプラント周囲炎を治療する、インプラントと細菌学、2010、pp.32-37

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内康雄 (TAKEUCHI YASUO)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号：60396968

(2)研究協力者

坂本光央 (SAKAMOTO MITSUO)  
独立法人理化学研究所・研究員  
研究者番号：50321766

小柳達郎 (KOYANAGI TATSURO)  
東京医科歯科大学大学院・医歯(薬)学総合研究科・大学院生