

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861637

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによるインプラント周囲細菌叢の網羅的解析と個別化抗菌療法開発

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of bacterial flora around dental implants by Next Generation Sequencer and development of antibacterial therapy.

研究代表者

大野 彩(木村彩)(Ono, Aya)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20584626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲炎は細菌感染による疾患であるが、未だ細菌構成は明らかではない。我々は、インプラント周囲炎罹患インプラント体の滲出液から、群レベル、属レベルでクラスター解析を行った。その結果、インプラント体周囲の細菌叢には個人差があること、インプラント周囲炎罹患インプラント体と歯周病罹患歯が類似した細菌叢に、健全インプラント体と健全歯が類似した細菌叢にある傾向が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is still unclear the constitution of bacteria in peri-implantitis. We analyzed the bacterial flora of the exudate around dental implant body suffered from peri-implantitis by NGS. The experimental results were revealed that there are differences between individuals in the bacterial flora, and the peri-implantitis and the periodontal disease were similar bacterial flora and the healthy dental implants and the healthy tooth were also similar in the bacterial flora.

研究分野：臨床疫学、歯科補綴学、口腔インプラント学

キーワード：口腔インプラント インプラント周囲炎 細菌叢 次世代シーケンサー メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント治療の急激な普及に伴い、我々はインプラント周囲炎という新たな病態に遭遇するようになった。インプラント周囲炎の発症率は過去の研究から2%から10%程度と報告されており、進行性の骨吸収を伴う重篤なインプラント周囲炎は、インプラント体の動揺を引き起こし、ひいてはインプラント体除去に至ることも多く、患者に大きな不利益を生じさせる。したがって、その病態を解明し、発症前に、もしくは重篤化する前にインプラント周囲炎を予知・診断し、進行性骨吸収を予防・停止させることは、臨床的観点に立つと大変重要な課題である。そして、歯周病と類似した感染症と考えられるインプラント周囲炎の病態解明には、細菌学的観点からのアプローチが欠かせない。

これまでもインプラント周囲炎の局所の細菌叢を分析した研究は実施されており、歯周病細菌と類似していると報告されている。しかし、これらの研究は細菌培養法を用いた検索がほとんどであり、単離培養不能な菌種が90%以上を占めるという口腔内細菌構成の全体像は明らかでない。また、すでにインプラント周囲炎に罹患したサンプルを解析しているため、発症に至るまでの細菌構成の変化やその生理的意義は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、インプラント周囲炎の患者から歯肉溝滲出液をサンプリングし、次世代シーケンサーによる細菌の16SrRNA解析により、細菌構成を網羅的に探索する。さらに、細菌構成と臨床診査結果を総合的に解析することによって、どのような細菌構成が、インプラント体周囲の難治性骨吸収や慢性炎症のリスク因子となるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生命倫理審査委員会へ研究遂行の許可申請を行った。

(2)インプラント周囲炎患者の抽出

下記の選定方針に則って、研究対象患者の抽出を行った。

<包含基準> (1)20歳以上の患者、(2)性別は問わない、(3)後述の診断基準により、インプラント周囲炎と診断された患者、(4)同一口腔内に、インプラント周囲炎に罹患していないインプラント体を有する、(5)同一口腔内に、歯周病罹患歯と非罹患歯を有する患者(歯周病罹患歯は、4mm以上の歯周ポケットを有する歯とする)

本研究のインプラント周囲炎の診断基準は規格化デンタルX線写真で、インプラント体周囲の生理的骨吸収範囲(年間0.2mm以内の骨吸収)を超える骨吸収像を認めること、インプラント体周囲のプロローピングデプスが4mm以上であること、インプラント体周囲からの排膿を認めることとした。また、過去2週間に抗菌薬投与を受けている患者、ステロイドや免疫抑制剤など、免疫に影響を与える薬剤を服用している患者、自己免疫疾患など、免疫不全疾患を有する患者は除外した。

この患者群に本研究の趣旨を説明し、同意の得られた患者を本研究の対象患者とし、インプラント周囲炎患者を集めた。

(3)臨床検体のサンプリングおよび16SrRNA解析

インプラント周囲炎患者から下記の試料を採取した。②～⑤は、①の同一患者内コントロールとして採取した。

インプラント周囲炎罹患部の歯肉溝滲

出液，インプラント周囲炎非罹患部(健全インプラント体)の歯肉溝滲出液，健全天然歯周囲の歯肉溝滲出液，歯周病罹患歯周囲の歯肉溝滲出液，唾液(細菌叢の標準化に使用)

得られた臨床検体は次世代シーケンサーを用いた 16SrRNA 解析を行う。その結果を基に，インプラント周囲炎の細菌叢を網羅的に把握した。なお，解析の効率化を図り，信頼性を高めるため，サンプルはペアにしてブラインド化の後，受託解析サービスを利用した 16SrRNA 解析を行った。

シーケンス前に実施する PCR の非特異的な増幅が結果に大きな影響を与えるため，増幅の妥当性を確認できる高感度 DNA 検出キットを用い，非特異的な増幅が起きていないか確認した。

(4) 臨床診査

臨床的リスク因子の同定のため，表 1 に示す項目の臨床診査を行った。

この項目には，インプラント周囲炎の罹患リスク因子の関与も検討するため，全身診査項目と埋入手術時の所見も加えた。

表1. 臨床パラメーター

| インプラント周囲診査 | 口腔内診査 |
|--------------|------------|
| 発赤の有無 | 歯周組織検査 |
| 腫脹の有無 | 細菌検査 |
| PD | プラークコントロール |
| BOPの有無 | 咬合状態 |
| pusの有無 | ブラキシズムの有無 |
| 動揺度 | 対合歯の種類 |
| 埋入手術時の所見 | 全身診査 |
| インプラント体の種類 | 喫煙状態 |
| 埋入トルク値 | 糖尿病の有無 |
| 水平的・垂直的骨量 | 骨粗鬆症の有無 |
| 骨増生の有無 | 出血傾向 |
| 即時負荷，即時修復の有無 | 服薬状況 |

4. 研究成果

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生命倫理審査委員会の承認を得て研究を実施した。

選定方針を満たすインプラント周囲炎患者 9 名(診査時平均年齢：66.6 歳，男性/女性：2/7 名，感染インプラント体周囲の平均プロービングデプス値：5.2mm，喫煙/非喫煙：2/7 名)のインプラント周囲炎罹患インプラント体，健全インプラント体，健全歯および歯周病罹患歯それぞれの周囲ポケットからペーパーポイントを用いて歯肉溝浸出液を採取した。さらに，自然唾液を採取した。自然唾液は日内変動が大きいいため，最も安定している「朝食もしくは口腔清掃後 2 時間以降経過した午前中」の条件下でサンプリングした。

9 名の口腔内の平均インプラント体埋入本数は 3.4 本であり，インプラント周囲炎と診断されたインプラント体本数は 1.1 本であった。インプラント周囲炎と診断されたインプラント体周囲の最大プロービング値は 10mm であった。

まず，最初にサンプリングした 4 名の検体を用いて，インプラント・天然歯周囲滲出液から，16SrRNA 解析に供する DNA の回収が，個体差やサンプル量の影響を受けずに可能であること，およびシーケンス前に実施する PCR の非特異的な増幅が起きていないことを確認した。

そして，患者 4 名分の検体から細菌 DNA を抽出し，16SrRNA 解析を実施し，カウント数が 10 以下の細菌に関しては，非特異的な検出とみなし，除外した。そして，群レベル(図 1)，属レベル(図 2)でクラスター解析を行った。

図1. クラスター解析 (群レベル)

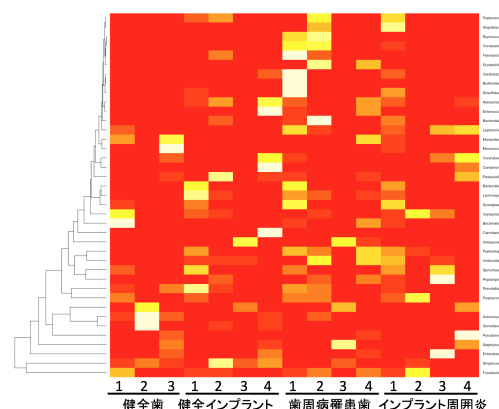
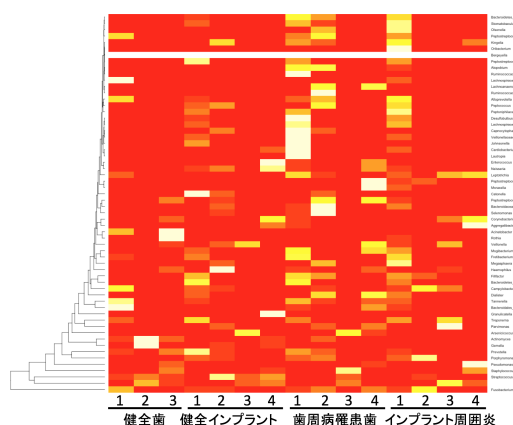


図2. クラスタ解析 (属レベル)



その結果、細菌叢には個人差があること、インプラント周囲炎罹患インプラント体と歯周病罹患歯が類似した細菌叢、健全インプラント体と健全歯が類似した細菌叢にある傾向を確認した。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 彩 (ONO AYA)
岡山大学病院・新医療研究開発センター・
助教
研究者番号：20584626

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

窪木 拓男
研究者番号：00225195

大野 充昭
研究者番号：60613156