

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593062

研究課題名(和文)インプラント周囲炎における特異的血清抗体価を用いた客観的診断法の開発

研究課題名(英文)Development of the objective diagnostic method using the specific serum antibody titer on peri-implantitis.

研究代表者

米田 哲(YONEDA, Satoshi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60420262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：被験者16名のインプラント20本を対象に研究を行った。レントゲン写真上で2mm以上の骨欠損を認めるインプラント周囲炎(以下、周囲炎)は9本であった。歯周病原細菌検査では周囲炎の有無に関わらずT.forsythesisが高頻度で検出された。

さらに被験者9名のインプラント11本(周囲炎7本)、天然歯9本を対象にマイクロバイーム解析を行った。その結果、歯周炎および周囲炎ではG.Alkalibacterium属、G.Halomonas属、G.Treponema属、G.Acidaminococcus属の割合が高かった。特にG.Acidaminococcus属は周囲炎で顕著に高かった。

研究成果の概要(英文)：This study was performed on 20 implants of 16 subjects. The number of the implant with peri-implantitis which have the bone defect more than 2mm on X-ray photograph was nine. In the examination of periodontopathic bacteria, it is not concerned with the peri-implantitis, but T.forsythesis was detected by high frequency.

Furthermore, microbiome analysis was conducted for 11 implants (7 peri-implantitis) of nine subjects, and nine natural teeth. As a result, with periodontitis and peri-implantitis, the rate of G.Alkalibacterium, G.Halomonas, G.Treponema, and G.Acidaminococcus is high. Especially G.Acidaminococcus is notably high with the peri-implantitis.

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 マイクロバイーム解析

1. 研究開始当初の背景

近年、歯牙欠損部の補綴治療においてインプラントが選択されることが多くなってきている。インプラントは高い生存率が報告されているが、インプラント周囲炎に罹患し除去を余儀なくされるものも存在する。長期生存をするためには定期的なメンテナンスが不可欠とされ、その際には様々な診査が行われている。

インプラント周囲の組織の状態をモニタリングする診断指標は、歯周病に対するものと同様なものが用いられる。具体的には、1) 付着プラークの評価、2) インプラント周囲粘膜の状態、3) インプラント周囲溝のプロービング深さ、4) インプラント周囲溝滲出液(perio-implant sulcus fluid: PISF)の分析、5) 放射線学的評価などがある。さらにインプラント特有の方法として6) 共振周波数の測定がある。インプラント周囲炎を評価するには、これらの指標を総合的に判断する必要がある。しかしながら、3)などはポケット探針により正確に測定することが上部構造の形態上の制約により不可能な場合がある。また、4) PISF 分析などは大学などの研究機関では測定できるが、一般開業医で測定することは困難な状況である。

一方、天然歯における歯周病の病態把握の方法として *P.gingivalis* や *A.actinomycescomitans* などの歯周病原菌の血清抗体価を測定する方法が開発されている。インプラント周囲炎の原因菌も歯周病と同一であり、インプラントのみが存在する口腔内では、「歯周病原菌の血清抗体価 = インプラント周囲炎重篤度」となりうる。しかしながら、インプラント治療を受けている大多数の者は、天然歯とインプラントが混在しているのが現状である。そのような場合、「歯周病原菌の血清抗体価 インプラント周囲炎重篤度」となる。

最近、インプラント周囲から特異的に *Staphylococcus aureus* (S.a. 菌) が検出されることが報告されている(文献2)。S.a. 菌がインプラント周囲炎の原因菌の一つであるかは不明であるが、S.a. 菌はチタンに特異的に親和性を有するとの報告(文献3)があり、osseointegration を喪失し、インプラント周囲溝に曝露されたインプラント体表面(チタン)に S.a. 菌が付着していることが予想される。インプラント周囲炎の悪化に伴いインプラント周囲溝に曝露するチタン表面積が増大し、S.a. 菌の付着量の増加に伴う S.a. 菌血清抗体価の上昇が予想される。

S.a. 菌の血清抗体価のモニタリングによりインプラント周囲炎の有無や、進行の程度を把握できる可能性がある。このような着眼点での報告は現在のところ見られず、この診査法の有効性が確認されたらインプラント治療の予後観察に客観的指標を導入できる。

2. 研究の目的

天然歯における歯周炎と同様に、インプラント周囲炎の診査において客観的情報を得るのは非常に重要なことである。しかし、現在のところ簡便にインプラント周囲炎の診断を単独で行える診査法は存在しない。

一方で、口腔内においてインプラント周囲より特異的に検出される細菌の存在が報告されている。本研究ではその細菌に着目し、その血清抗体価がインプラント周囲炎の診断に応用可能か検討し、インプラント周囲炎の新たな診査・診断方法を確立するのが目的である。

3. 研究の方法

徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の認可のもと 16 名の被験者において口腔内診査を行い、20 本のインプラントと 16 本の天然歯を対象にサンプルの採取を行った。尚、天然歯は歯周病検査で最も深い歯周ポケットの存在する部位を対象とした。

インプラント周囲炎の診断は放射線学的に行った。6 か月以内に撮影したレントゲン写真(デンタル写真)上で 2 mm 以上の骨吸収像を呈するものを、インプラント周囲炎と診断した。

PISF および歯肉溝浸出液を以下の方法により採取した。歯肉縁上プラークをコットンペレットで除去した後、コットンロールで簡易防湿し、弱風で乾燥した。インプラント周囲溝または歯肉溝に 2 本の 45 号の滅菌ペーパーポイント を 30 秒間挿入し、PISF または歯肉溝浸出液を採取し、以下の分析に用いた。

(1) S.a. 菌感染の検討

採取したサンプルより InstaGene Matrix(Bio-Rad)を用いて細菌の DNA を抽出した。抽出物した DNA を S.a. 菌認識 primer にて PCR 増幅した後、電気泳動を行い S.a. 菌感染の有無を検討した。

(2) 歯周病原細菌感染の検討

外部委託(BML)により以下の歯周病関連細菌の感染の有無を PCR-Invader 法により検討した。

測定菌種

- *A.actinomycescomitans*
- *P.gingivalis*
- *T.forsythensis*
- *T.denticola*

(3) マイクロバイーム解析

被験者 9 名のインプラント 11 本(内、周囲炎 7 本)、天然歯 9 本を対象として、次世代シーケンサーを用い 16S RNA 菌叢分析を行った。サンプルより DNA 画分を分離した後、PCR にて増幅し、外部委託(タカラバイオ) :

ドラゴンジェノミクスセンター)にて解析を行った。高速シーケンス解析を Genome Sequencer FLX System (ロシュ・ダイアゲノスティクス社)にて行い、QIIME パイプラインを用いてデータ解析を行った。また、RDP classifier による解析結果で bootstrap 確率が 0.8 以上のものについて分類名を集計し、各サンプルにおける菌属の組成 (%) を比較した。

4. 研究成果

被験者の内訳は男性 10 名、女性 6 名で平均年齢 68.6 ± 9.1 歳であった。16 名の被験者の 20 本のインプラントの内、レントゲン写真上で 2 mm 以上の骨欠損を呈するインプラント周囲炎と診断されたものは 9 本で、その骨欠損は平均 3.8 ± 1.7 mm であった。また、対象とした天然歯はすべて歯周ポケットが 4 mm 以上で歯周炎に罹患していた。

S.a. 菌の検出のために行った PCR では、primer の変更などを行ったが、S.a. 菌は最終的に検出できなかった。

歯周病原細菌感染の検討の結果、*A.actinomycetemcomitans* が検出されたインプラントはなかった。ほかの菌種では *P.gingivalis* が 2 本 (内、周囲炎 1 本)、*T.forsythensis* が 7 本 (内、周囲炎 3 本)、*T.denticola* が 2 本 (内、周囲炎 2 本) であった。

本課題の前提であった S.a. 菌の検出ができなかったため実験デザインの変更を行い、16S RNA 菌叢分析を行った。その結果、解析総リード数 12,438、解析総塩基数 41,261,275 base であった。各サンプルにおける菌属の組成を比較したところ、インプラントに特異的な菌属は認められなかった。しかし、*G.Alkalibacterium* 属、*G.Halomonas* 属、*G.Treponema* 属、*G.Acidaminococcus* 属で歯周炎 (天然歯)、健全インプラント、インプラント周囲炎において差異が認められた。

G.Alkalibacterium 属の組成は歯周炎 0.16%、健全インプラント 0.05%、インプラント周囲炎 0.12% であった (図 1)。以下同様に、*G.Halomonas* 属で 1.14%、0.39%、1.16% (図 2)、*G.Treponema* 属で 2.57%、1.47%、3.03% (図 3)、*G.Acidaminococcus* 属で 0.09%、0.05%、0.25% (図 4) で、特に *G.Acidaminococcus* 属がインプラント周囲炎で顕著に高割合で存在していることが判明した。

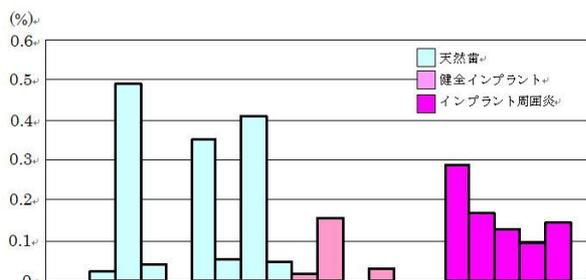


図 1 *Alkalibacterium*

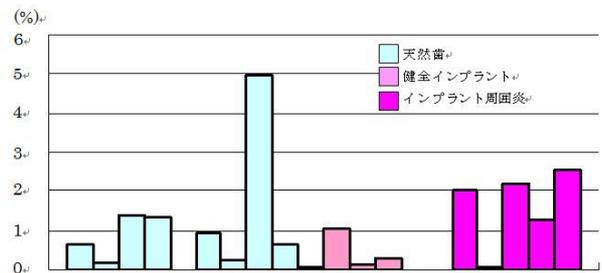


図 2 *Halomonas*

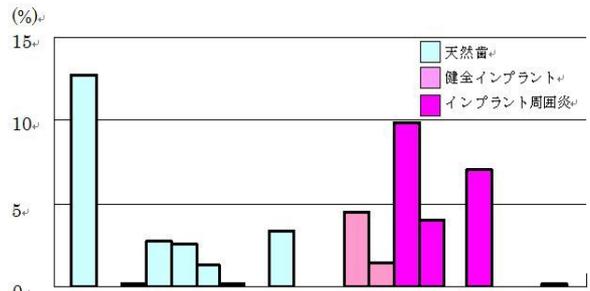


図 3 *Treponema*

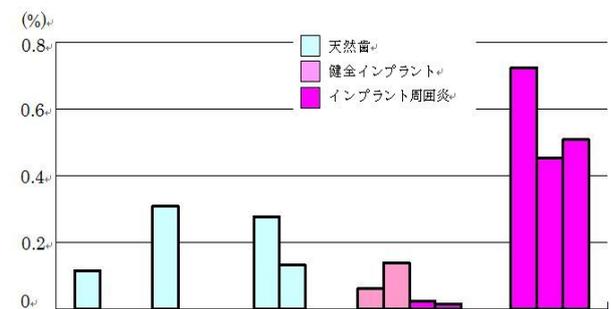


図 4 *Acidaminococcus*

過去の動物実験での報告 (Leonhardt A et al. Clin Oral Impl Res, 1992; 3: 112-119) では、歯肉炎 (インプラント周囲粘膜炎) や歯周炎 (インプラント周囲炎) で認められる細菌叢が類似した成長を示すことが示唆されていた。一方、今回の研究による分析の結果では、歯周炎の部位と健全インプラント、インプラント周囲炎の部位それぞれにおいていくつかの菌属では細菌叢の組成において差異が認められた。

今回の研究において、細菌叢の解析により天然歯 (歯周炎罹患歯) と健全インプラント、また、健全インプラントとインプラント周囲炎のあいだにおける細菌叢における差異があることが示唆される結果を得られた。今回の研究では菌属までの解析であったが、さらに菌種までの解析を行うことで、より特徴的な菌種が検出される可能性がある。また、1 菌種のみでインプラント周囲炎を診断することが困難であったとしても、複数の菌種を組み合わせることでインプラント周囲炎であることを診断することが可能になるかもしれない。

また、インプラント埋入から継時的に細菌叢の変化を調べることで、インプラント周囲炎の早期診断が可能になるかもしれない。そのためには上記の属を中心に菌種のさらなる解析が必要だと考える。

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〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 哲 (YONEDA, Satoshi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：60420262

(2) 研究分担者

木戸 惇一 (KIDO, Junichi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：10195315

(3) 連携研究者

なし