

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792321

研究課題名(和文)次世代シーケンシング技術を用いたインプラント周囲疾患の細菌叢機能と病態の解析

研究課題名(英文) Analysis of microbiota and its function associated with peri-implantitis using next generation sequencing technology

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲炎と歯周炎部位における細菌叢を網羅的に解析した結果、種多様性に差は認められなかったが、コアとなる細菌種は異なっていた。インプラント周囲炎は複合菌感染症であり多くの菌種によりバイオフィルムが構成されているが、量的に豊富な細菌種が必ずしも病変部位で活動的であるわけではなかった。また、インプラント周囲炎では歯周炎と比較しVirulence、Disease and Defense、Stress Responseなどのカテゴリーに分類される機能遺伝子の発現が上昇していた。

研究成果の概要(英文)：As the results of comprehensive analysis of microbiota in peri-implantitis and periodontitis, the core microbial species represented peri-implantitis were differed with those of periodontitis, although there were no significant differences in species richness and evenness. Peri-implantitis is a polymicrobial disease, and its biofilm was composed of various microbial species. While, the species that were abundant in biofilm was not necessarily active in the diseased sites. Expression of functional genes related with virulence, disease and defense, and stress response were elevated in the microbiota of peri-implantitis than in periodontitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：インプラント周囲炎 歯周病原細菌 次世代シーケンシング

### 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、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があった。また申請者が以前行った研究では、インプラント周囲炎で認められる細菌叢は歯周炎で認められる細菌叢とは異なり、またインプラント周囲炎における歯周病原細菌の検出率は必ずしも高くなかった (Koyanagi, Takeuchi et al. 2010)。露出したインプラント体粗面からの除染は非常に困難で、インプラント周囲炎に対する治療法は確立されていない。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

インプラント周囲疾患の原因である細菌感染に注目し、次世代シーケンサーを用いた分子生物学的手法により、バイオフィルムの細菌組成と機能の違いを明らかにし、インプラント周囲疾患の診断・治療を行う上で指標となる細菌学的因子を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) インプラント周囲炎構成細菌叢の解明

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、健常インプラントを有する者20名とした。採取予定部位において、臨床的評価〔歯周ポケット深さ (PPD)、プロービング時の出血 (BOP)、排膿 (SUP)〕およびデンタルエックス線写真による評価を行った。インプラント周囲炎はPPDが4mm以上で、BOPもしくはSUPを伴い、エックス線写真上で1スレッド以上の骨吸収が確認されるものとした。健常インプラントはPPDが4mm未満・BOPおよびSUPなし・エックス線写真上で骨吸収を伴わないもの、歯周炎はPPDが4mm以上・BOPあり・エックス線写真上で骨吸収が確認される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。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、PCR法により細菌の16S rRNA遺伝子の増幅を行い、

そこからアンプリコンを精製した。これを用いてパイロシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた全塩基配データのデノイズ、キメラ除去を行った後、BLAST検索をかけ、既存の菌種との相同性を評価した。類似度97%閾値でOTU解析を行い、各部位における細菌構成を調べた。

(2) インプラント周囲炎細菌叢の機能解析  
細菌バイオフィルムの組成だけでなく、その成熟は病原性を左右し、インプラント周囲疾患進行の機序を知る上で重要な要素であると考えた。そこで細菌構成に加え、病変部において細菌叢がどのような機能を発揮しているのについてメタゲノム解析により明らかにすることを予定した。しかし予備実験により、サンプルから抽出できるDNA量からその解析を行う事が困難である可能性が高まったため、プロトコルを見直し、トランスクリプトームによる解析に切り替えることとした。

被験者は同一口腔内にインプラント周囲炎罹患部位および歯周炎罹患部位を有する者12名とした。サンプルは歯肉縁上プラークを除去後、ペーパーポイント10本をポケット最深部まで挿入、30秒静置したものを回収、採取した。市販のキットを用いてRNAを抽出後、cDNAを合成、ショットガンシーケンシングにより配列を決定した。得られたデータについてrRNAのデータベースを用いて相同性検索を行い、相同性が認められたものはrRNA、認められないものをmRNAとして分類し、さらにそれぞれのクエリーに対し最も相同性の高い配列をそれぞれrRNA、mRNAのデータベースから探索し、細菌叢解析と機能解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) インプラント周囲炎構成細菌叢の解明  
インプラント周囲炎部位および歯周炎部位からは、全436,320本の配列 (平均10,908本) が解析に用いられ、これより19門・188属・235種の細菌が検出された (健常インプラントからのサンプルは細菌の同定ができたものとはできないものが存在していたため、本解析からは除外した)。インプラント周囲炎と歯周炎における種多様性についてShannon指数、OTU数、Chao1指数を基に比較したところ、両群間で構成細菌種の豊富さや均等性に差は認められなかった。また、主座標分析により比較した場合においても、インプラント周囲炎と歯周炎を明確にクラス分けすることはできず、同一個体から検出されたサンプル間の方が似た傾向を示した。また2群間で検出される細菌種について培養状態 (Cultured/Uncultured)、酸素要求性、グラム染色性について比較した場合でも差は認められなかった。

以上のことからインプラント周囲炎の細菌

叢は歯周炎に罹患した残存歯と基本的には類似しており、天然歯からインプラントへの細菌伝播が起きていると考えられる。一方、種レベルでみてみると、インプラント周囲炎と歯周炎ではCoreとなる細菌に違いが認められた。検出された細菌量を比較してみると、インプラント周囲炎では、*Prevotella nigrescens*が、歯周炎においては*Peptostreptococcaceae* sp.や*Desulfomicrobium orale*が多く検出された。また、歯周炎に特に関連が深いとされるRed complex (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*)といった細菌群は、歯周炎部位では全てのサンプルから検出されたが、インプラント周囲炎部位では必ずしも全ての部位からは検出されなかった。これら検出される細菌種やその割合、また共起する種・排除する種は2つの細菌叢で異なっていた。さらに、インプラント周囲炎の臨床症状と細菌の検出される細菌種について検討すると、深いポケットや骨吸収、排膿が認められる部位では、*Treponema* sp.の中でも未だ培養されておらず、その性質が不明な細菌との関連が疑われた。

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研究はごく僅かで、またその結果は必ずしも一致していない。Kumarら(2012)らはインプラント周囲炎部位ではグラム陰性菌、また嫌気性菌の割合が高い傾向が認められたと報告しており、これは本研究結果とも一致する。しかし彼らはまたインプラント周囲炎に認められる細菌叢は種多様性が低い、と報告している。インプラント周囲炎も歯周炎と同様、複数菌感染症であり、細菌を取り囲む環境がその細菌構成に影響を与えること、対象部位やサンプル採取法が違ふこともあり、この差違については今後も検討が必要である。またインプラント周囲炎と歯周炎はCoreな細菌種が異なり、バイオフィームとしての生態や病原性に違いを生じさせる可能性が示されたが、今後、in vitroにおける病原性の検討や臨床研究を通じて、さらに検討を加える必要がある。

(2) インプラント周囲炎細菌叢の機能解析  
インプラント周囲炎部位および歯周炎部位より、全 22,046,690リードが得られ、フィルタリング後のシーケンスではそれぞれのサンプルにおいて約30万リードが得られた。16S rRNA配列を基に細菌叢を解析したところ、インプラント周囲炎と歯周炎では共通して10門が検出され、*Clostridium*属が共通して多く検出された。またインプラント周囲炎と歯周炎における種多様性の比較(Shannon指数、OTU数、Chao1指数、主座標分析)についても、両群間で差は認められなかった。

種レベルでの比較では、インプラント周囲炎と歯周炎において*P. gingivalis*、*Fusobacterium* sp.、Uncultured *Flexisipes* sp.などが共通して検出されたが、*T. forsythia*や*T. denticola*は両群でともに検出されなかった。またインプラント周囲炎ではVirulence、Disease and Defense、Stress Responseなどのカテゴリーに分類される遺伝子の発現が歯周炎と比較して有意に多かった。

DNAを用いた解析とは異なり、サンプルから得られるRNAの全体を解析することは、インプラント周囲炎や歯周炎部位において実際に働いている遺伝子や細菌の解析に有効と考え、本実験を行った。今回の研究より、DNAとRNAのいずれを対象にした場合においても、インプラント周囲炎と歯周炎を構成する細菌種は2群で類似していることが明らかとなったが、実際に検出されている細菌を属レベルでみると、DNA Baseの解析では*Fusobacterium*、*Treponema*、*Porphyromonas*、*Streptococcus*、*Actinomyces*属などが多く検出されている一方で、RNA Baseの解析では*Clostridium*や*Bacteroides*属が主であった。また、トランスクリプトーム解析においては、Red complexの中でも*P. gingivalis*のみがインプラント周囲炎や歯周炎において高い割合で検出されているため、単純な比較はできないが、実際にバイオフィームを構成する細菌とその基で動いている細菌は異なること、また、複数菌感染症であっても、実際は少数のCoreとなる細菌があり、それが細菌叢全体のもつ病原性に強く影響を与えている可能性(Keystone Pathogens)もあると考えられた。また、インプラント周囲炎部位で歯周炎部位と比較し細菌の病原性やストレス反応に関連する機能遺伝子の発現が上がっていた。インプラントと天然歯では細菌叢をとりまく環境が異なっており、細菌が生存する上での栄養供給や代謝経路、チタンと天然歯との差などが影響した結果が現れているのかもしれない。この解析については今後も引き続き行い、その結果を公開する予定である。

## 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 1件)

Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Maruyama N, Ohkuma M, Izumi Y, Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis, J Clin Periodontol, 査読有, Vol. 40, No. 3, 2013, pp. 218-226  
DOI: 10.1111/jcpe

〔学会発表〕(計 6件)

芝 多佳彦、丸山 史人、竹内 康雄、渡辺孝康、小柳 達郎、中川 一路、和泉 雄一、インプラント周囲炎および歯周炎罹患部位の細菌群集比較を通じた周囲炎原因候補種と機能遺伝子の選定、第 87 回日本細菌学会総会、平成 26 年 3 月 28 日、東京  
芝 多佳彦、竹内 康雄、中川 一路、和泉 雄一、インプラント周囲炎・歯周炎罹患部位で活性を有する細菌群集比較を通じた周囲炎原因候補種の選定、第 78 回口腔病学会学術大会、平成 25 年 12 月 7 日、東京  
竹内 康雄、歯周病とインプラント周囲病変のリスク因子、第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会、平成 25 年 9 月 14 日、福岡

竹内 康雄、インプラント周囲の細菌叢 - わかっていること・いないこと -、第 56 回日本歯周病学会春季学術大会、平成 25 年 6 月 1 日、東京

丸山 緑子、竹内 康雄、丸山 史人、小柳 達郎、中川 一路、和泉 雄一、インプラント周囲炎と歯周炎では構成種と共起・排除関係が異なる、第 56 回日本歯周病学会春季学術大会、平成 25 年 6 月 1 日、東京

Maruyama N、Maruyama F、Takeuchi Y、Koyanagi T、Nakagawa I、Izumi、Comparison of the microbiota in peri-implantitis and periodontitis using pyrosequence、The 60th Annual Meeting of Japanese Associations for Dental Research、平成 24 年 12 月 14 日、新潟

〔図書〕(計 1件)

Koyanagi T、Takeuchi Y、Taniguchi Y、Izumi Y、Peri-implant disease and bacterial infection、WCOI year book 2011 of World Congress for Oral Implantology、2012、pp.26-32

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)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中川 一路 (NAKAGAWA ICHIRO)  
東京医科歯科大学大学院・医歯(薬)学総合研究科・教授  
研究者番号：70294133

小柳 達郎 (KOYANAGI TATSURO)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：70632173

(4)研究協力者

丸山 緑子 (MARUYAMA NORIKO)  
東京医科歯科大学大学院・医歯(薬)学総合研究科・大学院生

芝 多佳彦 (SHIBA TAKAHIKO)

東京医科歯科大学大学院・医歯(薬)学総合研究科・大学院生