

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09618

研究課題名(和文) 口腔インプラントの脱落要因を探る：インプラント周囲細菌叢の時空間的解析

研究課題名(英文) Spatio-temporal surveillance of peri-implant microbiota

研究代表者

下岸 将博 (Shimogishi, Masahiro)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：60747913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯科インプラントは口腔粘膜を貫通するように植立され、この貫通部には種々の細菌からなる細菌叢が形成されている。この細菌叢は口腔内衛生状態の影響を受けて構成菌種やその存在比率が変化することが知られているが、インプラント周囲における細菌叢の成立過程については明らかにされていない。そこで、インプラント治療を受けている患者を対象とし、インプラントが口腔内に露出してから継続的にインプラント周囲の細菌叢を採取し構成菌種を解析した。結果、インプラントが口腔内に露出して2週までは、患者に依らず類似した菌種で構成されているが、4週以降においては、患者によって構成菌種やその存在比率が多様化していく傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、無菌状態にあるインプラントが口腔内に露出してから非常に早期の段階で細菌叢が定着している事が明らかとなった。その上で、創傷治癒を完了した時点で個々の患者毎に特有の細菌構成となっており、患者の持っている環境因子、すなわち口腔疾患や全身疾患、生活習慣といったものの影響を非常に強く受けていることが示唆された。このことから、口腔内環境を悪化させる方向に変化させる環境因子の改善が細菌学的にも有効であることの立証への足掛かりとなるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：As dental implants are placed into the jawbone, biofilm which is composed of numerous microorganisms is formed at the transmucosal area. Microbiota which consist biofilm around implants is known to be altered by oral hygiene conditions. This event is considered to lead to the onset or progression of peri-implant inflammation and peri-implantitis which exhibit bone resorption. However, it is still not clear how indigenous microbiota around implants are established and be affected by environmental factors. Therefore, we conducted a comprehensive study by collecting peri-implant biofilms from patients with ongoing implant therapy. Samples were collected time-serially post exposure of implant to oral cavity. We investigated the bacterial species composing the biofilms at each time point. As a result, until 2 weeks post implant exposure, the composition of biofilms among patients did not differ. However, after 4 weeks, the composition or the abundance of bacterial species varied.

研究分野：歯科インプラント学

キーワード：歯科インプラント 細菌

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲炎は、骨内に包埋される歯科用インプラントの周囲組織の炎症性疾患で、歯周炎と同様に周囲粘膜の発赤や腫脹、歯槽骨吸収などを呈し、インプラント脱落の主要原因である。歯周炎は口腔細菌の感染症であり、進行した病変局所では *Porphyromonas gingivalis* など特定の細菌種が量的に多く検出されること、そのような細菌種を動物に実験的に感染させると歯周炎を再現できることが知られている。同様に、インプラント周囲炎の発症・進行においても特定の細菌種が重要な役割を担っている可能性はあるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。臨床的には、歯周炎に罹患既往のある場合には、歯周炎での検出頻度が高い細菌種がインプラント周囲でも検出され、歯周炎罹患の既往が、インプラント周囲炎の発症率と相関があり、インプラントの喪失におけるリスクとなることが報告されており、同一口腔内における歯周炎罹患歴とインプラント周囲の炎症や脱落などのトラブルとの因果関係が疑われる。一方で、歯周炎をはじめとする多くの細菌感染症において、複数の細菌種により形成された集団である細菌叢での細菌同士のコミュニケーションが重要であるという研究知見が近年相次いでおり、インプラント周囲炎はまさにその例であると考えられる。

このような考え方に基づいて、申請者らの先行研究では、インプラント周囲炎の病変局所に存在する細菌の活動性を、同じ被験者の口腔内にある歯周炎の細菌活動性と比較し、インプラント周囲炎と歯周炎とでは、細菌の活動性に違いがあることを見いだした。その解析は、細菌がゲノムの遺伝情報を転写する際に合成する mRNA を、病変部の全ての細菌種について一度に調べたもので、転写という現象を細菌の活動性として捉えている。この研究成果では、未だ口腔内での役割が不明な細菌種が病変部で高い活動性を示していたことを報告している。しかしこの研究は、進行したインプラント周囲炎および歯周炎の病変細菌叢の試料を、炎症の生じている一時点でのみ採取して解析したものであり、ときに慢性的な経過をたどる両疾患において細菌叢がどのような変化を経るのかについては、依然として不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、インプラント周囲細菌叢を術直後から月・年単位で経時的に採取して、16S rRNA 遺伝子解析により細菌種の種類を網羅的に調べ、細菌叢の時系列的な変動を可視化すること、および量的増加・減少を示す細菌群・種を見いだすことを目的として、将来的に細菌叢の変動の予測や新規な治療ターゲットとしての考慮の必要な細菌種を特定することを目的とした。

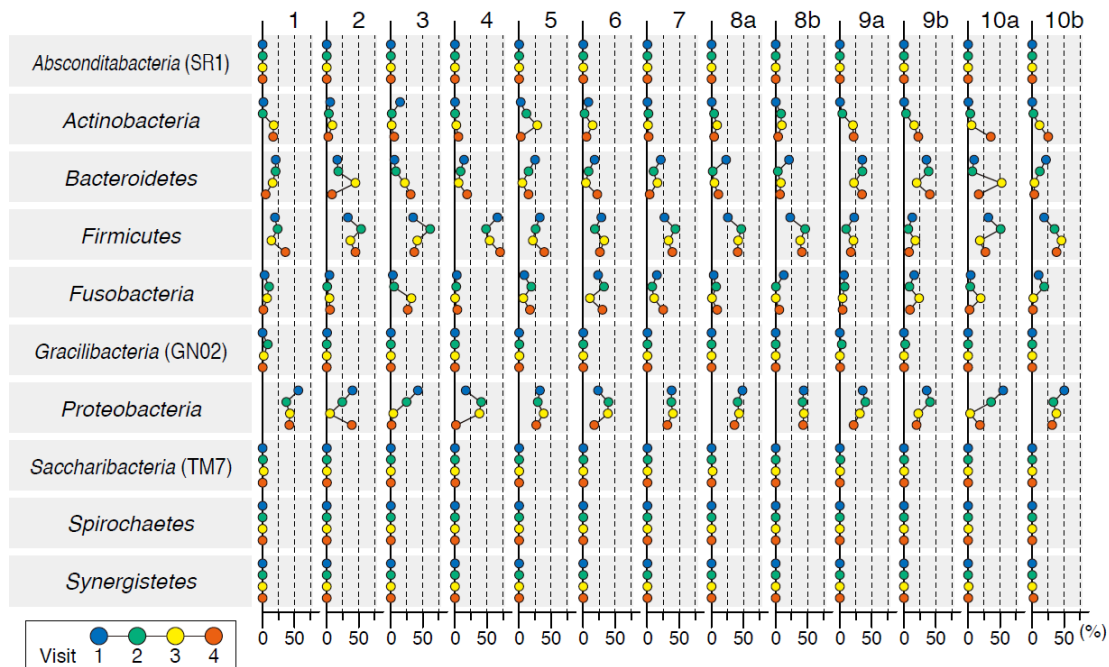
3. 研究の方法

現在インプラント治療を受けている患者で、上顎または下顎の臼歯部欠損に対して 2 回法にてインプラント埋入手術を行ったものに対し、術後 1、2、4、6 週 (Visit 1, 2, 3, 4) の来院時にインプラント周囲溝より細菌叢サンプルを採取した。また、臨床所見としてインプラント周囲溝からの出血や排膿の有無を確認した。研究対象者から書面による研究参加への同意を得た後、二次手術 1 時間前に Amoxicillin 1g を服用させ、二次手術を行った。術後 1 週間は 0.2% Benzethonium chloride による含嗽を行うよう指示した。なお、加療中の全身疾患を有する者、喫煙歴のある者、3 ヶ月以内に抗菌薬、免疫抑制剤の投与を受けた者、残存歯に 4mm 以上の歯周ポケットが存在する者は研究対象者から除外した。

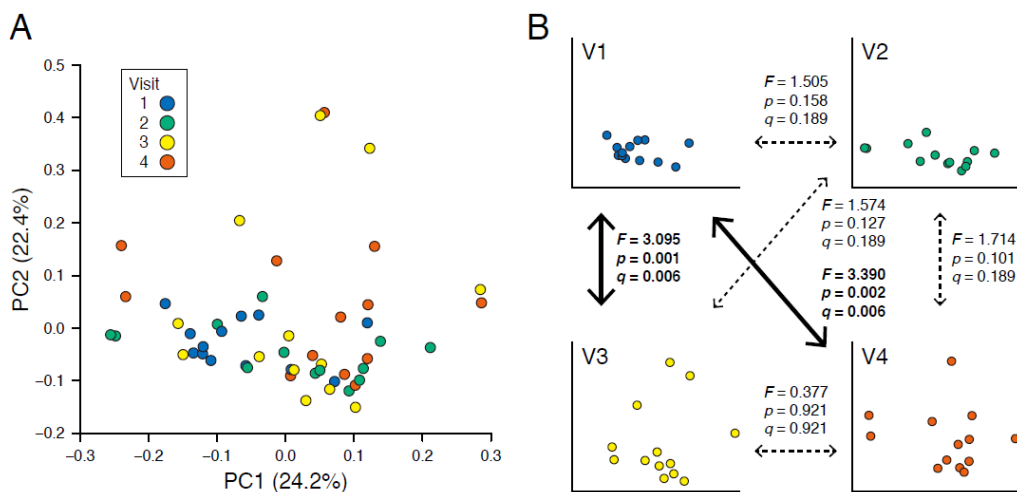
各観察時点において、インプラント周囲溝に 40 号のペーパーポイントで 60 秒静置し、溝内の細菌叢サンプルを採取した。細菌叢サンプルから細菌 DNA を抽出し、16S rRNA 領域特異的プライマー (V3-V4 領域, 314F-805R) を用いて PCR 増幅を行い、次世代シーケンサー (Miseq® System, Illumina, Inc., California, USA) によって塩基配列を決定した。得られた塩基配列を基に Illinois Mayo Taxon Organization from RNA Dataset Operations を用い、Human Oral Microbiome Database より細菌種の同定および系統解析、およびクラスター解析に使用した。

4. 研究成果

(1) サンプルから得られた細菌 DNA を解析した結果、細菌叢全体における存在比率では、90% 以上が 31 菌種 (属レベル) によって占められていた。全ての観察時点において、*Streptococcus* 属や *Veillonella* 属を含む *Firmicutes* 門が一定の存在比率を維持していた。術後早期では、*Proteobacteria* 門が優勢であるが、歯周病既往のある患者では、時間経過と共に *Fusobacteria* 門の増加が認められた。

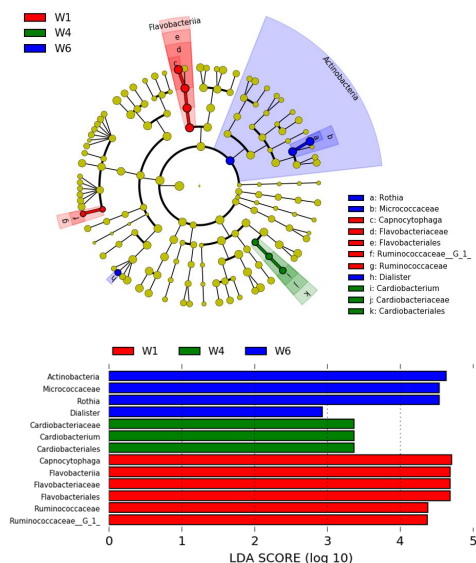


(2) 主座標分析による結果では、術後2週まではサンプル間の多様性は小さく、4週から増大していく傾向にあった。PERMANOVA 検定では、術後1週と4週、および術後1週と6週の間で有意差が認められた ($p < 0.05$)。



(3) また、細菌叢データを患者および観察時点毎に分類し、Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) による群間比較解析を行った。Capnocytophaga 属は、術後1週の時点では一定の存在比率を占めているが、術後6週では減少し、対して Rothia 属が増加する事が示された。前者は -ラクタム、マクロライド系の抗菌薬に耐性を示す事も多く、後者はインプラント周囲炎を生じた部位からも検出され、高い活動性を示す事が報告されているものである。

総括すると、手術創部の治癒が完了する術後2週までは生体の免疫機構や滲出液による栄養状態等によって、細菌叢の中で優勢な細菌種が限定されている可能性が示唆された。ただし、本研究では術前に抗菌薬、術後に含嗽剤を使用しており、これらの影響を考慮する必要がある。粘膜貫通部の軟組織が成熟した後は、患者の口腔内各所に存在する細菌叢や、口腔清掃状態、生活習慣等の影響を受けつつ構成菌種が増加し、多様化していくものと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komatsu Keiji, Shiba Takahiko, Takeuchi Yasuo, Watanabe Takayasu, Koyanagi Tatsuro, Nemoto Takashi, Shimogishi Masahiro, Shibasaki Masaki, Katagiri Sayaka, Kasugai Shohei, Iwata Takanori	4. 巻 10
2. 論文標題 Discriminating Microbial Community Structure Between Peri-Implantitis and Periodontitis With Integrated Metagenomic, Metatranscriptomic, and Network Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 596490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.596490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nemoto Takashi, Shiba Takahiko, Komatsu Keiji, Watanabe Takayasu, Shimogishi Masahiro, Shibasaki Masaki, Koyanagi Tatsuro, Nagai Takahiko, Katagiri Sayaka, Takeuchi Yasuo, Iwata Takanori	4. 巻 6
2. 論文標題 Discrimination of Bacterial Community Structures among Healthy, Gingivitis, and Periodontitis Statuses through Integrated Metatranscriptomic and Network Analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 00886-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.00886-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimogishi Masahiro, Watanabe Takayasu, Shibasaki Masaki, Shiba Takahiko, Komatsu Keiji, Nemoto Takashi, Ishihara Kazuyuki, Nakano Yoshio, Iwata Takanori, Kasugai Shohei, Nakagawa Ichiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Patient specific establishment of bacterial composition within the peri implant microbiota during the earliest weeks after implant uncovering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 964-971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12898	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 SHIMOGISHI M, SHIBASAKI M, KAWAKAMI S, KURODA S, NAKATA H, TACHIKAWA N, KASUGAI S, SHIOTA M
2. 発表標題 Compositional change of peri-implant microbiota
3. 学会等名 The 50th Anniversary Annual Meeting of the Japanese Society of Oral Implantology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下岸 将博, 渡辺 孝康, 柴崎 真樹, 中野 善夫, 春日井 昇平, 中川 一路
2. 発表標題 デンタルインプラントの口腔内露出後に生じる周囲細菌叢の経時変化
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 柴崎 真樹, 下岸 将博, 渡辺 孝康, 丸川 恵理子
2. 発表標題 遊離歯肉移植術により角化粘膜を付与したインプラント周囲の細菌叢構成の変化
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	渡辺 孝康 (Watanabe Takayasu) (70725514)	日本大学・歯学部・講師 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	中川 一路 (Nakagawa Ichiro) (70294113)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

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