

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462929

研究課題名(和文)メタゲノム解析を応用したインプラント周囲炎の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathology of periimplantitis using metagenomic analysis

研究代表者

綿本 隆生 (WATAMOTO, Takao)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：60420444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌叢(細菌の多種多様な集合)の解析はすべての細菌、特に培養することが出来ない細菌の検出および遺伝子情報を入手することが可能であり、その菌種組成および細菌叢機能解析を行うことが出来る非常に有効な方法である。したがって、細菌が原因である感染症の一つであるインプラント周囲炎の病態を明らかにするため、インプラント周囲の細菌叢の解析を行った。  
しかし、本研究においてインプラント周囲炎に特徴的な細菌の組成及び機能を発見するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Microbiome analysis can detect all microorganisms, especially bacteria that cannot be cultured, and obtain genome information. It is very effective method that can analyze bacterial composition and function. Therefore, microbiome analysis around implant tissue was carried out to elucidate pathology of periimplantitis that caused by oral bacteria.  
However, significant discovery that characterized bacterial composition and function of inflamed tissue around implant was not found in this study.

研究分野：補綴・理工系歯学

キーワード：マイクロバイオーーム インプラント 歯周組織 メタジェノミクス

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロバイオーーム（細菌叢）は人体のほぼあらゆる部分に生存し、皮膚表面上、消化管内、鼻腔内、口腔内に存在する。一部の細菌は疾患を引き起こすこともあるが、ほとんどの場合、微生物群は宿主であるヒトと共生し、ヒトの生存に不可欠な機能を提供している。

歯科補綴領域においてインプラント周囲炎は最も高頻度に起こる合併症（約 12%）であり、その病態は歯周疾患と同様に主として嫌気性菌による感染症とされているが、そのマイクロバイオーームは特定されていない。進行したインプラント周囲炎は顎骨の吸収に伴うインプラント体の喪失のみならず顎骨骨髓炎など重篤な炎症を引き起こす可能性がある。

従来、そのマイクロバイオーームは単一菌種の分離・培養により特定が行われていた。それらは試験管内で増殖させることが困難である菌種がほとんどであるため、ほんのわずかの種類の微生物しか同定することができなかった。近年、環境サンプルから直接に回収されたゲノム DNA を扱う新しい研究分野であるメタジェノミクスの発展により、マイクロバイオーームから直接 DNA を精製し、その DNA 塩基配列を解析することが可能となった。DNA 塩基配列は計算機を用いて、細菌に特異的な 16S リボソーム RNA (16S) を同定するため (David AW Soergel et al. ISME J. 2012) 様々な種類の微生物群の存在を同定することが可能である。したがって、従来の方法では検出が不可能であった難培養菌の検出およびゲノム情報入手が可能となり、マイクロバイオーームの詳細な検討が可

能となった。

米国国立衛生研究所が設立した研究者らからなるコンソーシアムにより、健常者の正常微生物群の構成が初めて明らかにされ (Elizabeth K Costello et al. Science. 2009) ほぼ全てのヒトは、病原性をもつ微生物を保持しているが、健常者において病原微生物は疾患を引き起こすことはなく、単に宿主に生存するマイクロバイオーームと共存するだけであることが明らかになった。

さらにインプラント周囲炎は、口腔内マイクロバイオーームと密接に関連し、その変動により、疾患が引き起こされることが予想される。しかし、その本態は明らかではなく、効果的な治療法も実現しておらず、欠損補綴として非常に有効であるインプラント補綴治療にとって解決すべき問題である。したがって、本研究によりインプラント周囲炎におけるマイクロバイオーームの分析を行い、その病態を解明することが必要である。さらに、そのことによりインプラント周囲炎の効果的な予防法および治療法の開発につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は健常成人におけるマイクロバイオーームのシーケンス解析を行い、その菌種組成および細菌叢機能を明らかにすることである。さらに、それらをインプラント周囲炎の罹患者におけるマイクロバイオーームの解析結果と比較して特徴を明らかにし、その病態を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) 正常歯周組織および正常インプラント

## 周囲組織のマイクロバイーム解析

被験者として健常成人 10 名をそれぞれ選択し、歯周組織もしくはインプラント周囲組織からプラークを回収し、核酸を抽出する。

核酸の 16S rRNA を PCR 法にて増幅し、次世代シーケンサーを用いて、配列情報を解析する。解析された配列情報をデータベースと照合し、菌種の同定を行う。さらに細菌叢のメタゲノム配列データを分析し、データベースと照合することにより、菌種の組成を解析する。また、細菌の DNA 配列の遺伝子を同定し、データベースを使用し、相同性検索やクラスタリング分析を行い、口腔内細菌叢の実態と機能の解明を行う。

### (2) 疾患部位の歯周組織およびインプラント周囲組織のマイクロバイーム解析

被験者としてインプラント周囲炎に罹患している健常成人 10 名を選択し、インプラント周囲組織からプラークを回収し、核酸を抽出する。以後は(1)と同様に菌種同定、菌種組成解析、細菌叢機能解析を行う。

### (3) マイクロバイームの比較・検討および病態の解明

(1) 及び(2)にて解析したマイクロバイームの特徴を比較、検討し疾患、部位に特異的な変動を分析し、インプラント周囲炎の病態解明を行う。

### (4) インプラント周囲浸出液の分析

インプラント周囲の浸出液を採取し、ELISA 法 ( Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay ) にて炎症性サイトカイン ( TNF- $\alpha$ 、IL-8、MIP-1 $\beta$ 、IL-6 ) の分析を行った。

## 4 . 研究成果

正常歯周組織、正常インプラント周囲組織及びインプラント周囲炎組織のマイクロバイーム解析を行うことを目的として、健常成人 10 名、健常インプラント保有者 10 名及びインプラント周囲炎罹患患者 8 名をそれぞれ選択し、歯周組織もしくはインプラント周囲組織からプラークを回収し、核酸の抽出を行った。さらにインプラント周囲の浸出液の採取を行った。

16s rRNA を増幅させ、菌種同定、菌種組成解析、細菌叢機能解析を行ったが、正常歯周組織、健常インプラント周囲組織及びインプラント周囲炎組織間で、顕著な差を見いだすことができなかった。この結果は、技術的な点やデータベースの使用などに未熟な点があり、今後さらなる改善により、よりよい結果が得られるものと考えられる。

炎症性サイトカインは健常インプラント周囲組織浸出液において TNF- $\alpha$ 、IL-8、MIP-1 $\beta$ 、IL-6 の平均値はそれぞれ 16.0、51.7、47.6、29.5 であった。インプラント周囲炎組織浸出液において TNF- $\alpha$ 、IL-8、MIP-1 $\beta$ 、IL-6 の平均値はそれぞれ 23.1、99.5、44.6、56.8 であった。MIP-1 $\beta$  を除きインプラント周囲炎組織で優位に高値となった。

## 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 )

Watamoto T, Egusa H, Sawase T, Yatani H., Screening of

Pharmacologically Active Small Molecule Compounds Identifies Antifungal Agents Against Candida Biofilms., 査読あり, Front Microbiol., 22. 2015. 1453., DOI:10.3389/fmicb.2015.01453,  
Miyahara K, Watamoto T, Uto Y, Sawase T., Effect of Macroscopic Grooves on Bone Formation and Osteoblastic Differentiation., 査読あり, Implant Dent., 24(4). 2015. 370-376., DOI: 10.1097/ ID.0000000000000257

〔学会発表〕(計1件)

里 美香, 加藤初美, 綿本隆生, 酒井桃子, 澤瀬 隆. インプラント周囲粘膜炎に対する音波式電動歯ブラシの効果, 日本口腔インプラント学会, 2015年1月31日 - 2月1日 .長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

綿本 隆生 (WATAMOTO, Takao)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
客員研究員

研究者番号: 60420444

### (2)研究分担者

加藤 初美 (KATO, Hatsumi)

長崎大学・病院(歯学系)・医員

研究者番号: 30613608

澤瀬 隆 (SAWASE, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
教授

研究者番号: 80253681