

〔学位論文〕

インプラント周囲炎インプラントと健康なインプラント周囲における
細菌叢の比較と検討

田村 直

北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科 口腔機能修復・再建学系
クラウンブリッジ・インプラント補綴学分野

Comparison of Bacterial Flora in Peri-implantitis and Healthy implant sulcus

Naoki TAMURA

Division of Fixed Prosthodontics and Oral Implantology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido**Key words** : peri-implantitis, bacterial flora, obligate anaerobic condition, 16S rDNA

緒 言

現在口腔インプラント治療は、歯科補綴治療における主要な選択肢の一つとなり、極めて高い成功率が示されている一方で、インプラントの失敗の報告も増加傾向にある。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、機能しているインプラント周囲組織に影響を及ぼし、結果として支持骨を吸収させる炎症として定義されている (Albrektsson & Isidor, 1994)。しかしながら、インプラント周囲炎に関する詳細は、あまり良く知られていないため、原因や治療法は未解決のままである。インプラント周囲炎の発症には、偏性嫌気性グラム陰性桿菌種 (以下OGNRs)、特に黑色色素産生細菌や運動性桿菌やグラム陰性偏性嫌気性球菌が重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら近年、口腔内には1万種を超える多種多様な微生物種が存在する可能性が報告されており (Keijsers et al., 2008)、VNC (viable but non-cultivable) な細菌を含む、未同定細菌種が多く存在することが示唆されている。その中でも糖非分解性偏性嫌気性グラム陽性桿菌種 (以下AAGPRs) が、しばしば歯周炎部位から検出されることから、慢性歯周炎の病原菌であると指摘する報告もある (Uematsu & Hoshino, 1992)。

本研究の目的は、酸化還元電位が -400mV 以下での厳密な偏性嫌気性状態における培養法で、生育した全ての

細菌株について16S rDNA gene-based PCRにより16S全塩基配列得ることで、そこから全ての菌種を同定し、インプラント周囲炎の細菌叢と健康なインプラント周囲溝の細菌叢と比較検討することである。

材料および方法

本研究は、北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科倫理委員会承認 (承認番号41) に基づき、全ての患者に対する説明と同意を得て実施された。対象は上部構造装着後6ヶ月以上経過したインプラント埋入患者とし、インプラント周囲炎の臨床症状のある患者、もしくは臨床症状のない患者を選択した。対象はそれぞれ、プロービング深さ (以下, PD)、プロービング時の出血、排膿、X線写真での骨吸収、動揺を検査し、Peri-implantitis, Healthy implantの2群に分けた。全身疾患のある患者と、6週間以内に抗菌薬の投薬を受けている患者、さらに洗口剤を使用している患者は除外した。試料はインプラント周囲溝内滲出液とし、無菌のペーパーポイント (ISO# 50) を使用して採取した。試料の希釈・塗抹・分離培養の全ての行程は、嫌気グローブボックス内 ($80\%N_2$, $10\%H_2$ and $10\%CO_2$) で行った。試料は滅菌PBS (phosphate-buffered saline) に懸濁後、粉碎した試料を連続10倍希釈により 10^{-6} まで希釈した後、ガラスビーズ法でBHI血液寒天培地 (3.7% brain heart infusion, 1.5% agar, 5% defibrinated sheep blood, 0.1%

受付：平成23年3月30日

hemin, 0.1% menadione) 上に塗抹し, 嫌気グローブボックス内で37°C, 7日間培養した. 血液寒天培地上における検出数の平均をcolony forming units (CFUs/ml) で定量した. 同定には16S rDNA特異的なユニバーサルプライマーを使用し, コロニーダイレクト法によりPCRを行った. PCR産物は, Takara Bio Inc. (Shiga, Japan) にて塩基配列の解析を行った. 得られた菌株の16S rDNA塩基配列は, DDBJ (DNA Data Bank of Japan) のBlast search programを利用して, GenBankのデータベースと比較し, 98%以上の相同性を持つ細菌種を検索した. Peri-implantitisとHealthy implantの総菌数の平均, およびAAGPRsとOGNRsがPeri-implantitisとHealthy implantの細菌叢に占める割合について, 統計解析ソフトStat View 5.0を使用して, Mann-Whitney U-testにより統計処理を行なった.

結 果

本実験には, 北海道医療大学歯科内科クリニックに来院した, 30人の部分無歯顎患者が対象となった. Peri-implantitisは15人(女性8人, 男性7人), Healthy implantが15人(女性4人, 男性11人)であった. 平均年齢は, Peri-implantitisで56.9歳, Healthy implantで63.4歳であった. 平均PDは, Peri-implantitisで6.8mm, Healthy implantが1.3mmであった. 総菌数の平均(logarithm CFUs / ml)は, Peri-implantitisで 6.34 ± 0.52 , Healthy implantで 5.16 ± 0.86 でありPeri-implantitisとHealthy implantの総菌数に統計的な有意差が認められた ($p < 0.01$). Peri-implantitisでは, グラム陽性球菌(43%)が最も多く, 次いでグラム陽性桿菌(35%), グラム陰性桿菌(20%)で, グラム陰性球菌(2%)が最も少なかった. 優勢細菌属は, *Streptococcus* (34%), *Eubacterium* (13%), *Prevotella* (10%), *Actinomyces* (6%), *Fusobacterium* (4%). Healthy implantでは, グラム陽性球菌(50%)が最も多く, 次いでグラム陽性桿菌(27%), グラム陰性球菌(16%)で, グラム陰性桿菌(7%)が最も少なかった. 優勢細菌属は, *Streptococcus* (45%), *Actinomyces* (14%), *Veillonella* (14%), *Propionibacterium* (8%)であった. 両者ともに*Streptococcus*が最も優勢であるが, その割合はHealthy implantで多かった. またPeri-implantitisでは, Healthy implantと比べ, AAGPRsとOGNRsの割合が明らかに多く, Peri-implantitisでAAGPRs(18%), OGNRs(20%), Healthy implantでAAGPRs(3%), OGNRs(6%)であった. AAGPRsとOGNRsが, Peri-implantitisとHealthy implantの細菌叢に占める割合には, 統計的な有意差が認められた

($p < 0.05$). Peri-implantitisでは, *Streptococcus*に次ぐ優勢細菌属が, AAGPRsの*Eubacterium*と, OGNRs種の*Prevotella*であった. Peri-implantitisでは69菌種が検出され, Healthy implantでは53菌種が検出された. Peri-implantitisとHealthy implantの間で観察された構成細菌種には明らかな違いが認められた. Peri-implantitisにおける優勢な偏性嫌気性菌は, *E. nodatum* (7%), *P. intermedia* (5%), *F. nucleatum* (3%), *Filifactor alocis* (3%), *E. brachy* (3%), *Parascardovia denticolens* (3%), *Parvimonas micra* (3%)であった. 対してHealthy implantでは, *Veillonella* spp. (14%), *Propionibacterium acnes* (5%), *Pseudoramibacter alactolyticus* (3%), *Parvimonas micra* (2%)であった.

考 察

本研究は, 進行したインプラント周囲炎の周囲組織における優勢な細菌種を同定し, その細菌叢を明らかにすることを目的とした. Peri-implantitisにおけるCFUは有意にHealthy implantよりも高かった. 本研究では, グラム陽性球菌がPeri-implantitis, Healthy implant共に多く検出されたが, その構成細菌種は大きく異なっていた. また, Peri-implantitisでは, グラム陰性球菌は最も少ない検出割合であったが, Healthy implantでは, 偏性嫌気性グラム陰性球菌である*Veillonella* spp. が最も優位な細菌であった. この知見は, Fürstら(2007)の報告と一致する. さらに, Peri-implantitisにおいてSocransky & Haffajee(2002)が報告しているレッド, オレンジコンプレックスに属するOGNRsである*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Parvimonas micra*や, 他の主要な慢性歯周炎に特徴的な細菌種を検出した. 歯周病原性偏性嫌気性グラム陰性桿菌種は, 2つのグループ共に検出された. グラム陽性桿菌の細菌叢に占める割合は, Peri-implantitisでは35%, Healthy implantでは27%であり, 共にグラム陽性球菌に次ぐ割合を占めている. 一方, Peri-implantitisでは, 多くのAAGPRs(18%)が検出されているが, Healthy implant(3%)ではほとんど検出されておらず, 構成細菌種は大きく異なっていた. 本研究より, インプラント周囲炎部において, 従来報告されている歯周病関連細菌種は高頻度で検出されており, それらの細菌種がインプラント周囲炎に関与していることが示唆された. 一方で, これらの特定細菌の他, インプラント周囲炎部周囲溝深部では, AAGPRsもまた優勢細菌種であることが明らかになった. 以上の結果は, AAGPRsの存在が, 協調してインプラント周囲組織破壊に誘導し, 口腔細菌叢の変化による複合感染により細菌

学的なリスクを増加する等、AAGPRsがインプラント周囲炎において重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、本研究のPeri-implantitisにおいて、糖非分解性細菌はAAGPRs (13%), *Prevotella* (10%), *Fusobacterium* (4%), *P. micra* (3%), *P. gingivalis* (1%) が検出された。Uematsu & Hoshino (1992) は、AAGPRs はしばしば歯周炎部の優勢細菌であると報告している。加えて、本研究で検出された *E. nodatum*, *E. saprophenum*, *E. minutum*, *Filifactor alocis* は、酪酸を産生することが知られている。*Fusobacterium* spp. や *Prevotella* spp. などのOGNRsもまた、酪酸を産生することが報告されている。実際、本実験において様々なAAGPRsが存在していることから、歯周炎部と同様に、進行したインプラント周囲炎の周囲組織底部では、酪酸を含む種々の短鎖脂肪酸がAAGPRsの代謝産物として産生されていることが示唆される。従って、AAGPRsが産生した酪酸が、インプラント周囲炎の一つの病原因子として一定の役割を担っている可能性が高い。しかしながら、AAGPRsの多くはその培養の困難さや、小さいコロニー、通常の生化学的試験への反応の低さのため、詳細な研究が遅れている。

結 論

本研究では、厳密に管理された嫌気的条件下で試料の処理と培養を行い、生育した全菌株について16S rDNA全塩基配列による菌種の同定をすることによって、インプラント周囲炎の細菌叢を明らかにした。本研究により、インプラント周囲炎に罹患したインプラント周囲溝底部は高度な偏性嫌気状態にあり、AAGPRsや糖非分解性偏性嫌気性グラム陰性桿菌が最も優勢に生息していることが明らかとなった。このことにより、従来の歯周病関連細菌のみがインプラント周囲炎の発生と進行に関与する特定の細菌群ではなく、AAGPRsなどの、偏性嫌気性かつ糖非分解性細菌もまたインプラント周囲組織を破

壊に導く危険性の高い細菌であり、インプラント周囲炎を引き起こすとともに、インプラント周囲炎の細菌叢のなかで、重要な役割を担っている可能性が示唆された。

参考文献

- Albrektsson T & Isidor E. Consensus report of session IV. In : Lang NP, Karring T, editors. Proceedings of the First European Workshop on Periodontology. London : Quintessence, 365-369, 1994.
- Fürst MM, Salvi GE, Lang NP & Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. Clin Oral Implants Res 18 : 501-508, 2007.
- Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, vander Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, ten Cate JM & Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. J Dent Res 87 : 1016-1020, 2008.
- Socransky SS & Haffajee AD. Dental biofilms : difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 28 : 12-55, 2002.
- Uematsu H & Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. J Periodont Res 27 : 15-19, 1992.



田村 直

北海道医療大学口腔機能修復・再建学系 クラウンブリッジ・インプラント補綴学分野

平成8年3月 私立函館ラ・サール高等学校 卒業

平成12年4月 北海道医療大学歯学部 入学

平成18年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成18年4月 北海道医療大学臨床研修医

平成19年4月 北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科 入学

平成23年3月 北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科 修了