

論文審査の結果の要旨

氏名：高橋 佑次

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：インプラント周囲炎において優勢である *Corynebacterium durum* 検出キットの開発と臨床応用

審査委員：(主査) 教授 福本 雅彦

(副査) 教授 小方 頼昌

教授 河相 安彦

教授 久山 佳代

本研究は、インプラント周囲炎と関連が報告された *Corynebacterium durum* (*C. durum*) を分離・定量可能な選択培地と口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種を検出可能な MultiplexPCR 法の開発, および選択培地を応用した *C. durum* 検出キットの開発を行ったものである。

口腔インプラント治療において、インプラント周囲炎は osseointegration 獲得後に生じる生物学的併発症として、今日ではインプラント治療を行う者にとって日常的に経験する疾患となった。本疾患は細菌感染が主因となり、インプラント周囲支持骨の吸収や周囲軟組織の炎症といった歯周炎と類似した病態を呈する。しかし一方で、歯周炎と比較して本疾患の進行は速く、歯周炎と同様の治療法では効果が限定的であるなどの相違も見られ、支持骨の吸収が進行した重度のインプラント周囲炎ではインプラント体の脱落が生じ、患者の QOL を著しく低下させる。インプラント周囲炎と関連する細菌は、歯周炎と類似しているとの報告もあるが、その詳細については不明な点が多く、未だ議論がなされている。その様な中、近年のインプラント周囲炎細菌叢をメタトランスクリプトーム解析により検索した研究によると、*Corynebacterium durum* (*C. durum*) が本疾患に対して特異的な細菌であることが報告された。しかしながら、培養法を用いて本菌とインプラント周囲炎との関連性を調査した詳細な研究報告は未だない。そこで本研究は、*C. durum* を分離・検出するための選択培地を開発すること、また口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種 (*C. coyleae*, *C. diphtheriae*, *C. durum*, *C. matruchotii*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. xerosis*) を同時に検出・同定可能な Multiplex PCR 法を確立すること、本選択培地による培養法を用いて、インプラント周囲炎における本菌の詳細な分布を調査すること、加えて選択培地を応用することにより、簡易かつ臨床応用可能な *C. durum* 検出キットの開発を目的とした。

C. durum 選択培地は、Heart Infusion (25 g/L) に寒天 (15 g/L) を添加した HI 寒天培地に本菌が良好な発育を示したために、これを基礎培地とした。この基礎培地に、sucrose (10 g/L), および *C. durum* が感受性を示さない抗菌薬の NaF (200 mg/L), phosphomycin (100 mg/L), colistin (10 mg/L), amphotericin B (2 mg/L) を添加したものを選択培地とし、本選択培地を *Corynebacterium durum* selective medium (CDSM) と命名した。BHI blood 寒天培地と比較して、CDSM は *C. durum* の全ての供試菌株において平均 98.3% と高い回収率を示した。口腔で優勢である同属菌の *C. matruchotii* の発育を顕著に抑制した。そのため、今回開発した CDSM の選択性は優れていることが示された。

また、本研究では口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種を迅速かつ正確に同定・検出することが可能な PCR 法の確立を試みた。本方法は、6 菌種を正確に検出可能であり、6 菌種が試料中に混在していても正確に検出・判別可能であった。また、代表的な口腔細菌に対しては全く反応しなかった。この結果から、本方法は *Corynebacterium* 属菌を同定・検出するのに有用であると判断された。

次に、インプラント健常群 20 名とインプラント周囲炎群 20 名のインプラント周囲溝滲出液を採取し CDSM に播種・培養を行い、各群における *C. durum* の検出頻度を調査した。各群において、*C. durum* が検出されたものは、インプラント健常群で 11 名 (55%)、インプラント周囲炎群で 20 名 (100%) であった。また、各群における総細菌数に対する *C. durum* の割合は、インプラント健常群で 0.01%、インプラント周囲炎群で 0.67% であり、インプラント周囲炎群における *C. durum* の割合がインプラント健常群と比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。そのため本菌は、インプラント周囲炎と関連があることが示唆された。

さらに、血液が及ぼす *C. durum* における発育の違いを *in vitro* にて調査した。*C. durum* は血液濃度が濃くなるにつれて、酸素濃度が低い培地下層までの発育が認められた。この結果から、インプラント周囲炎ではインプラント周囲局所に炎症が生じ、血液量が多くなることから、*C. durum* に適した環境であることが考えられた。

以上のことから、開発した選択培地 CDSM を応用し、チェアサイドで簡易に *C. durum* を検出できるキットの開発を試みた。*C. durum* は galactose 分解能を有する。その生物学的性状を利用し、CDSM に pH 指示薬である bromocresol purple を添加することによって、本菌が酸を産生した結果、色調変化が生じるように改良を加えた。その組成は、HI (25 g/L) に寒天 (15 g/L)、galactose (10 g/L)、NaF (20 mg/L)、phosphomycin (100 mg/L)、colistin (5 mg/L)、amphotericin B (2 mg/L) および bromocresol purple (20 mg/L) を添加したものとし、Modified-CDSM と命名した。CDSM と比較して、Modified-CDSM は *C. durum* の全ての供試菌株において、平均 98.9% と高い回収率を示した。この Modified-CDSM を用いて *C. durum* 検出キットを作製した。ペーパーポイントにてインプラント周囲溝滲出液を採取し、検出キット全面に塗布後、インキュベーターにて 72 時間の培養を行うこととし、キットの培地色が紫色から黄色へ変化したものを本検出キットでは陽性と判定することと定義した。

次に、インプラント健常群 60 名、インプラント周囲粘膜炎 30 名、インプラント周囲炎 30 名からインプラント周囲溝滲出液を採取し、Modified-CDSM による *C. durum* 数算定と *C. durum* 検出キットで本菌の検出を試みた。その結果、インプラント周囲粘膜炎群とインプラント周囲炎群はインプラント健常群と比較して、有意な *C. durum* 数の増加を認めた。故に、インプラント周囲炎のみならず、インプラント周囲粘膜炎の段階から、病巣局所で *C. durum* が優勢であることが示唆された。一方、検出キットによる判定では、健常群では 60 名中 58 名が陰性、周囲粘膜炎群では 30 名中 28 名が陽性、周囲炎群では 30 名中 29 名が陽性を示した。本検出キットの感度は 95.0、特異度 96.7、有効度 0.96、陽性反応的中度 96.6、陰性反応的中度 95.1 と全てにおいて高値であったため、本検出キットの高い有用性が示された。

以上の結果から以下の結論を得た。

1. *C. durum* 選択培地 (CDSM および Modified-CDSM) は高い選択性を有した。
2. 口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種を対象とした Multiplex PCR 法は各菌種を正確に検出可能であった。
3. *C. durum* はインプラント周囲疾患に有意に多く検出されることが明らかとなった。
4. *C. durum* は血液供給により嫌気条件下でも発育可能であることが明らかとなった。
5. *C. durum* 検出キットは、インプラント周囲疾患の病態把握に応用可能であった。

これらの研究成果は、インプラント周囲溝細菌叢について新たな知見を得たものであり、今後の歯科医学ならびに口腔インプラント学の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文は、博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

年 月 日