

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

高橋 佑次

日本大学松戸歯学部 口腔インプラント学講座

(指導： 小方 頼昌 教授)

目次

参考論文	．．．．．	2
Abstract	．．．．．	3
抄録	．．．．．	5
緒言	．．．．．	6
研究I： <i>Corynebacterium durum</i> とインプラント周囲炎との関連性の検討		
材料および方法	．．．．．	9
結果	．．．．．	13
研究II： <i>Corynebacterium durum</i> 検出キットの開発		
材料および方法	．．．．．	16
結果	．．．．．	18
考察	．．．．．	20
結論	．．．．．	22
参考文献	．．．．．	23
図表	．．．．．	26

参考論文

本論文は、主となる参考論文「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」口腔検査学会雑誌：掲載予定，および副となる参考論文「*Corynebacterium durum* とインプラント周囲炎との関連性の検討」日本口腔インプラント学会誌：第 34 巻，52-60，2021 をまとめたものである。

Abstract

A relationship between *Corynebacterium durum* and peri-implantitis was recently reported based on 16S rRNA-based taxonomic profiles. The purpose of the study I was to develop selective media for the isolation of *C. durum* and multiplex PCR method for the identification of oral-associated *Corynebacterium* species. The second purpose was to investigate the usefulness of monitoring *C. durum* level as a clinical indicator for evaluating peri-implant tissue.

The purpose of the study II was to develop *C. durum* detection kit (CD-kit), which is helpful in implant treatment.

PCR primers for multiplex PCR were designed based on partial sequences of 16S rDNA of oral-associated *Corynebacterium* species. In order to examine the bacterium population in the oral cavity, *Corynebacterium Durum* Selective Medium (CDSM) was herein developed for the isolation of *C. durum*. CD-kit was developed by adding some modifications to CDSM. The proportions of *C. durum* in peri-implant sulcus fluids (PISFs) collected from periodontally healthy patients (n=60) with implants as a control. The patients with peri-implant mucositis (n=30) and with peri-implantitis (n=30) were also examined. Furthermore, PISFs samples were evaluated using CD-kit. Colonies on CDSM and CD-kit were sub-cultured for bacterial species identification by PCR analysis using the primers designed in the present study.

The mean numbers of *C. durum* in the patients with peri-implant mucositis and peri-implantitis were significantly higher than that in the periodontally healthy patients with implants ($p<0.05$). CDSM, a multiplex PCR method using the primers designed in the present study, and CD-kit were useful for the isolation, identification, and quantity of *C. durum*. Moreover, it was suggested that monitoring *C. durum* level was useful as a clinical indicator for evaluating peri-implant tissue conditions.

Key words: peri-implantitis, *Corynebacterium durum*, bacteria flora in peri-implant sulcus

抄 録

目的： 研究 I では、口腔常在細菌である *C. durum* に着目し、本菌を検出・定量可能な選択培地の開発、および口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種を対象とした Multiplex PCR 法の開発を目的とした。さらに、インプラント健常者とインプラント周囲炎患者における本菌の分布を詳細に調査し、*C. durum* がインプラント周囲炎に対して特異的であるか否か検討することを目的とした。また研究 II では、研究 I で開発した選択培地を改良し、チェアサイドで簡易に検査可能、かつ検出感度と定量性に優れた *C. durum* 検出キットの開発を目的とした。

方法： *C. durum* 選択培地（CDSM）と *C. durum* 検出キットを用いて、インプラント健常群 60 名、インプラント周囲粘膜炎群 30 名、及びインプラント周囲炎群 30 名から採取したインプラント周囲溝滲出液（PISFs）を用いて *C. durum* の検出を行った。なお菌種同定は開発した Multiplex PCR 法を用いた。

結果および結論：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、PISFs 中の *C. durum* 数が有意に多かった ($p<0.05$)。本検出キットの感度、特異度、及び有効度等はいずれも高値であった。以上のことから、開発した *C. durum* 選択培地と PCR 法による *C. durum* の同定・検出方法は有用であると考えられた。さらには、本菌はインプラント周囲疾患と関連があることが示唆された。加えて、開発した *C. durum* 検出キットは、病態推移の把握に活用できると推察された。

キーワード： インプラント周囲炎， *Corynebacterium durum*， *C. durum* 検出キット

緒 言

Brånemark らによって確立されたインプラント治療^{1, 2)}は、欠損補綴において予知性の高い有効な選択肢として広く普及している。しかし、本治療の普及に伴い、様々な併発症が報告されるようになった。その中でも、**osseointegration** 獲得後に生じる生物学的併発症として、インプラント周囲疾患のインプラント周囲炎とインプラント周囲粘膜炎が知られている。インプラント周囲粘膜炎とインプラント周囲炎の罹患率は研究によって対象や条件が異なるが、**Derks** ら³⁾はインプラント周囲粘膜炎の罹患率は 42.9%、インプラント周囲炎の罹患率は 21.7%と報告した。また、**Ogata** ら⁴⁾はインプラント周囲粘膜炎の罹患率は 33.3%、インプラント周囲炎の罹患率は 9.7%と報告した。2 つの報告において数値に相違はあるものの、インプラント治療を行う多くの歯科医師にとって、インプラント周囲疾患は日常的に経験する併発症である。インプラント周囲疾患は、歯周病と比較されることが多く、実際にインプラント周囲粘膜炎と歯肉炎は、炎症性細胞浸潤の範囲、炎症性細胞の割合といった病理組織学的観点からも類似している⁵⁾。しかし、インプラント周囲炎と歯周炎は異なる点が多く、インプラント周囲炎の炎症性細胞浸潤は歯周炎の約 2 倍、マクロファージと形質細胞の割合が歯周炎に比べて有意に多く、新生血管密度も高いと報告されている⁶⁾。このことは、インプラント周囲炎が歯周炎と比較して炎症の範囲が広く急性であることを示している。

インプラント周囲炎に対する確固たる治療法は確立されておらず、歯周病と同様の治療法では効果が限定的であるとの報告もある^{7~9)}。インプラント周囲炎が不可逆性疾患であることやインプラント周囲炎に対する確固たる治療法が確立されていないことから、定期的なメンテナンスを行うことにより、可逆性病変であるインプラント周囲粘膜炎の段階でインプラント周囲組織の問題を発見し、不可逆性病変であるインプラント周囲炎に移行する前に治療を行うことが重要

である。しかし、インプラント周囲粘膜炎からインプラント周囲炎への移行を察知することは、一般的に行われているメンテナンス時の検査項目（プロービング時の出血、粘膜の発赤・腫脹、周囲粘膜の閉鎖性等）から得られる臨床所見のみでは予測困難な場合も見受けられる。

インプラント周囲炎の発症には、プラークが関与すると考えられ¹⁰⁾、その細菌叢は歯周炎で見られる細菌と同様であるという報告もされている¹¹⁾。また近年、歯周炎とあまり関連性のない細菌やウイルス（腸内細菌、カンジダ属、Epstein-Barr ウイルス等）が見られることが示されており、複合的かつ不均質な感染症であると考えられている^{12~15)}。Shiba ら¹⁶⁾ はメタトランスクリプトーム解析により、インプラント周囲炎細菌叢において活動性が高くネットワーク構造の中核を担う細菌 23 菌種を見出し、それらの細菌を *interacting core taxa* と定義した。この様に、インプラント周囲炎細菌叢を遺伝子学的に解析した論文は近年散見されるようになったが、遺伝子学的解析では、試料中に死菌の遺伝子が混在すれば検出されてしまうため、試料中の細菌が生菌であるかの判断は細菌培養法を用いることが必要となる。しかし、インプラント周囲炎細菌叢の細菌培養法に基づいた解析は今日まで十分に行われておらず、Schwarz ら¹⁷⁾ は詳細な細菌分布が示されていないと警鐘を鳴らしている。

現在、インプラント治療で行われている細菌検査は、主に *Porphyromonas gingivalis* を始めとする Red complex 細菌などの歯周病原細菌を指標としているが、検査結果と臨床所見とが一致しない場合があり、その有効性について疑問の声もある¹⁸⁾。その理由は、細菌検査の指標が口腔常在細菌ではないため、それら細菌を保菌していなければ、歯周疾患およびインプラント周囲疾患に罹患した時に細菌検査を実施しても検出されるとは限らない事による。Tsuzukibashi ら¹⁹⁾ は、インプラント周囲炎に特異的な *interacting core taxa* 中の 1 菌種である *Corynebacterium durum*（以下 *C. durum*）に関する研究から本菌が口腔常在細菌叢

の一部であることを解明した。そこで著者は、口腔常在細菌でありインプラント周囲炎との関連が報告された *C. durum* を指標とする細菌検査法を確立できないかと着想した。しかしながら、*C. durum* のみを分離・培養可能な選択培地と口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種を正確に同定する PCR 法は確立されていない。また、インプラント周囲炎における *C. durum* の分布を培養法にて調査した報告もない。

そこで研究 I は、口腔常在細菌である *C. durum* を検出し、定量可能な選択培地の開発および口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種を対象とした Multiplex PCR 法の開発を行うことを第 1 の目的とした。さらに、インプラント埋入で健常な者とインプラント周囲炎に罹患している患者における本菌の分布を調査し、*C. durum* がインプラント周囲炎に特異的な菌であるかの検討を目的とした。

また研究 II は、研究 I で開発した選択培地を改良し、チェアサイドで簡易に検査ができ、かつ検出感度と定量性に優れた *C. durum* 検出キットの開発を目的とした。

研究 I : *Corynebacterium durum* とインプラント周囲炎との関連性の検討

材料および方法

1. 供試菌と培養法

本研究は、表 1 に示した細菌株を実験に供した。これらの細菌の継代用培地には Bact™ Brain Heat Infusion (BHI, Becton, Dickinson and Co.Sparks, MD, USA) に 1 % yeast extract (Becton, Dickinson and Co.) を添加した寒天培地を使用した。培養は 37°C, 24 時間, 5%CO₂ に設定した CO₂ インキュベーター (NAPCO® Model 5400; Precision Scientific, Chicago, IL, USA) にて好気培養を行った。

2. *C. durum* 選択培地の開発

Tsuzukibashi らは口腔 *Corynebacterium* 選択培地 (Oral *Corynebacterium* selective Medium: OCM) を開発した¹⁹⁾。OCM には、口腔 *Corynebacterium* 属以外グラム陽性菌とグラム陰性菌の発育を阻害する高濃度の phosphomycin と、ヒト口腔内で検出される真菌である *Candida* 属の発育を阻害する amphotericin B が添加されている。しかし、OCM は *C. durum* 以外の口腔 *Corynebacterium* 属菌種である *C. matruchotii* の発育を許すため、*C. durum* のみを選択的に発育させるために改良を加えた。すなわち、口腔 *Corynebacterium* を対象に薬剤感受性試験を行い、*C. durum* が感受性を示さない抗菌薬の検索を行った。薬剤感受性試験はマイクロブロス希釈法を用いて行った。*C. durum* が非感受性を示した抗菌薬は NaF であった。*C. durum* の NaF に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は 3,000 mg/L であった。また、OCM は口腔優勢菌である *Neisseria* 属菌の発育を若干許すため、10 mg/L の colistin を添加することとした。これらの結果を踏まえて *C. durum* 選択培地 (Corynebacterium Durum Selective Medium: CDSM) を開発した。その組成は、Heart Infusion (HI, Becton, Dickinson and Co.) 25 g/L に寒天 15 g/L, sucrose 10 g/L,

NaF 200 mg/L, phosphomycin 100 mg/L, colistin 10 mg/L, amphotericin B 2 mg/L を添加したものとした。HI に寒天, sucrose, および NaF を加え, オートクレーブで滅菌後, 50°C に冷却し, 抗菌薬である colistin, phosphomycin および amphotericin B を添加した。

3. CDSM における口腔関連 *Corynebacterium* 属の回収率

BHI 液体培地にて 37°C, 24 時間, 5%CO₂ インキュベーターにて前培養した口腔関連 *Corynebacterium* 属菌液を 0.9 mL PBS (0.01 M, pH7.2) にて 10 倍段階希釈し, その菌液 100 μL を CDSM および BHI Blood 寒天培地 (5%ウサギ脱繊維素血液加 BHI, 1.5%寒天) に塗布し 37°C, 48 時間, 5%CO₂ インキュベーターにて培養を行った。培養後, CDSM と BHI Blood 寒天培地上に形成された集落数から各々の集落形成単位 (colony forming units; CFU) を算定し, 口腔関連 *Corynebacterium* 属菌の回収率を求めた。

4. 菌種同定

菌種同定は, 口腔 *Corynebacterium* 属 6 菌種の 16S rDNA の配列に基づき設計した菌種特異的プライマーを用いた Multiplex PCR 法により行った。

5. PCR プライマーの設計

菌種特異的プライマーは, 日本 DNA データバンク (DDBJ, 静岡, 日本) から得られた口腔 *Corynebacterium* 属 6 菌種の 16S rDNA の配列 (*C. coyleae* accession number X96497, *C. diphtheriae* accession number X82059, *C. durum* accession number Z97069, *C. matruchotii* accession number X82065, *C. pseudodiphtheriticum* accession number AJ439343, *C. xerosis* accession number X81914) に基づき, CLUSTAL W を用いてマルチプル・シーケンス・アライメント解析を行うことにより設計した。

6. Multiplex PCR 法の確立

口腔 *Corynebacterium* 属 6 菌種を対象とした Multiplex PCR 法による菌種同定の手順を以下に示す。PCR 反応液は、0.2 μ M のそれぞれのプライマー、10 μ l の 2×MightyAmp Buffer Ver. 2 (タカラバイオ, 滋賀, 日本), 0.4 μ l の MightyAmp Polymerase (タカラバイオ, 滋賀, 日本), および 5.6 μ l の菌液とした。PCR 条件は、98°C, 2 分間の初期変性を行った後、98°C10 秒, 68°C1 分を 1 サイクルとして、30 サイクル行った。PCR 産物は 2.0%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

7. 対象被験者

本研究の被験者は、日本大学松戸歯学部附属病院口腔インプラント科を受診した患者で、本研究の趣旨に賛同し、文書による同意を得た者とした。除外基準は、妊婦、矯正治療中、著しい歯列不正、過去 6 か月以内に抗菌薬・抗炎症薬を継続的に内服、および口腔内局所投与を受けた者とした。また、全ての被験者に本研究の趣旨、研究への参加の可否が今後の診療に影響を及ぼさない旨を説明し、書面をもって同意を得た。本研究は、日本大学松戸歯学部倫理審査委員会の承認を得て行われた (承認番号 EC 18-033 号)。

8. 臨床パラメーター

プロービングデプスの測定はプラスチック製プローブ (COLORVUE® PROBE, Hu-Friedy Mfg. Co., 東京, 日本) を用い、プロービング圧が 0.2 N~0.3 N となるように挿入し、1 mm 単位で測定した。また該当部位に平行法にてエックス線撮影を行った。

対象者は、①インプラント周囲溝をプラスチックプローブにて 6 点測定し、その最深部が 3 mm 以内、②プロービング時の出血を認めない、③インプラント周

囲溝からの排膿を認めない，④エックス線画像上で骨吸収を認めない，上記の①～④の条件をすべて満たす者が健康なインプラント周囲組織をもつ健常者（インプラント健常者，20名）として分類された。一方，⑤インプラント周囲溝を6点測定し，その最深部が5 mm以上，⑥プロービング時の出血を認める，⑦インプラント周囲溝からの排膿を認める，⑧エックス線画像にて進行性の骨吸収を認める，上記⑤～⑧の条件をすべて満たす者はインプラント周囲炎患者（20名）として分類された²⁰⁾。

9. 試料採取と培養法

インプラント周囲溝滲出液（Peri-Implant Sulcus Fluids, 以下 PISFs）の採取は，唾液による汚染を防ぐためにコットンロールによる簡易防湿を行い，上部構造に付着したプラークを小綿球で清掃した。その後，各被験者の対象部位に #40 滅菌ペーパーポイント（JM ペーパーポイント，モリタ，大阪，日本）を2本，10秒間挿入して 0.05 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.2）を含んだ滅菌チューブに保管した。氷冷しながら20秒間超音波処理（50 W, 20 kHz, Astrason® System model XL 2020, Farmingdale, NY, USA）し，試料を分散したものを培養試料とした。その後，10倍段階希釈を行い，総細菌数算定用培地として BHI Blood 寒天培地および本研究で開発した CDSM に播種し，37°C，48時間，5%CO₂ インキュベーターにて培養を行った。培養後，培地上に形成した集落数を数えることにより，CFU を算出し，各試料中の総細菌数と *C. durum* 数を求めた。なお，CDSM 上に発育した集落が *C. durum* であるかを確認するために，培地上の一定区画における集落を白金耳にて釣菌し，1 mL の蒸留水が注入された滅菌チューブに懸濁したものを PCR 試料とした。その後，本研究で開発した Multiplex PCR 法にて，CDSM 上に *C. durum* のみが発育していることを確認した。また，総細菌数に占める *C. durum* の割合も算出した。その後，インプラント健常者群とインプラント周囲炎

患者群におけるインプラント周囲溝深さは Student *t*-test, また両群の *C. durum* 検出頻度は Chi-square test を用いて比較検討を行った。総細菌数, *C. durum* 数, および総細菌数に占める本菌の割合はオープンソース統計解析ソフトウェア”R”Ver.3.5.0 を用い, Mann-Whitney U test で検定を行った。 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

10. *C. durum* と *C. matruchotii* の発育に対して血液が及ぼす影響

HI 液体培地に 0.2%寒天を加えた半流動寒天培地に, 0%, 0.1%, 0.25%および 0.5%のヒツジ脱繊維血液を加えることにより, 4 種類の試験培地を作製した。*C. durum* ATCC 33449 株と, 対照として同属菌の *C. matruchotii* ATCC 14266 株を BHI-Y 液体培地にて前培養後, その菌を PBS (1 M pH 7.2) にて 2 回洗浄後, PBS で再び懸濁した菌液を作製した。その菌懸濁液から白金線にて釣菌し, 半流動寒天培地中に空気が混入しない様, 注意しながら速やかに穿刺し, 5%CO₂ インキュベーターにて 37°C, 48 時間の好気培養を行った。培養後, 各半流動寒天培地中における *C. durum* と *C. matruchotii* の発育を肉眼的に比較検討した。

結 果

1. CDSM における口腔関連 *Corynebacterium* 属の回収率

表 1 は CDSM 上における口腔関連 *Corynebacterium* 属の回収率を示す。CDSM における *C. durum* の回収率は, 平均 98.3%であった。また, *C. diphtheriae* と *C. coyleae* は *C. durum* と同様, CDSM 上で良好な発育を示した。一方, 同属菌の *C. matruchotii*, *C. pseudodiphtheriticum* および *C. xerosis* は全く発育を示さなかった。CDSM 上における *C. durum* の集落像を図 1 に示す。培養 48 時間後, 集落の大きさは 1 mm 程度, 境界が明瞭な円形状のスムーズコロニーを呈した (A)。稀に, ラフコロニーが認められることもあった (B)。

2. Multiplex PCR 法による口腔関連 *Corynebacterium* 属の同定

本研究で開発した口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種の 16S rDNA に基づいて設計した菌種特異的プライマーの領域と塩基配列を図 2 に示す。*C. coyleae*, *C. durum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. matruchotii*, *C. xerosis* および *C. diphtheriae* の増幅サイズは、それぞれ 197 bp, 284 bp, 410 bp, 569 bp, 815 bp および 917 bp であった。本プライマーを用いた Multiplex PCR 法における全菌種の検出限界は、PCR テンプレート 5.6 μ l あたり 5 cells 以上であった。本 Multiplex PCR 法による口腔関連 *Corynebacterium* 属と代表的な口腔細菌の同定・検出結果を図 3 に示す。口腔関連 *Corynebacterium* 属は、それぞれ該当するサイズの増幅物を認めたが、*Corynebacterium* 属以外の代表的な口腔細菌には全く増幅物を認めなかった。また、口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種全てを含んだ試料においては、それぞれの菌種に該当する増幅物を認めた。

3. CDSM を用いた PISFs 中における *C. durum* の検出状況

被験者の臨床パラメーターおよび *C. durum* の検出頻度を表 2 に示す。インプラント健常者およびインプラント周囲炎患者の性別（男：女）は 7：13 および 4：16、年齢は平均 53 歳（range：36-76 歳）および 64 歳（range：43-82 歳）であった。インプラント健常者のインプラント周囲溝深さは平均 2.35 mm（range：2-3 mm）に対し、インプラント周囲炎患者では平均 7.85 mm（range：5-11 mm）と有意に深かった（ $p<0.05$ ）。また、*C. durum* が検出された被験者はインプラント健常者 20 名中 11 名（55%）であったのに対し、インプラント周囲炎患者では 20 名全て（100%）から検出され有意差を認めた（ $p<0.01$ ）。インプラント周囲炎患者と健常者における PISFs の *C. durum* 数を比較したものを図 4 に示す。インプラント周囲炎患者と健常者から採取した PISFs 中における総細菌数は、 8.2×10^6 CFU/ml（ $\pm 1.56\times 10^7$ CFU/ml）および 4.9×10^5 CFU/ml（ $\pm 6.62\times 10^5$ CFU/ml）であっ

た。また、インプラント周囲炎患者における *C. durum* 数は、いずれの被験者においても 1.0×10^2 CFU/ml 以上で、平均 5.5×10^4 CFU/ml ($\pm 4.83 \times 10^4$ CFU/ml) であった。そして、総細菌数に対するその割合は 0.67% であった。一方、インプラント健常者における *C. durum* 数は、最大 8.0×10 CFU/ml で平均 3.1×10 CFU/ml ($\pm 3.19 \times 10$ CFU/ml) であった。そして、総細菌数に対するその割合は 0.01% であった。以上のことから、インプラント周囲炎患者の総細菌数および *C. durum* 数は、インプラント健常者と比較して有意に多く検出され、総細菌数に対する割合も有意に高かった ($p < 0.05$)。

4. *C. durum* と *C. matruchotii* の発育に対して血液が及ぼす影響

C. durum と *C. matruchotii* における血液濃度別発育・増殖の結果を図 5 に示す。*C. durum* においては血液を含まない培地は上層三分の一程度までの発育に留まり、血液 0.1% および 0.25% の培地は中層までの発育・増殖を認めた。また、血液 0.5% の培地は更に下層までの発育・増殖を認めた。一方、同属菌種の *C. matruchotii* は、*C. durum* の様な血液濃度による発育・増殖の違いは認めなかった。

研究Ⅱ： *Corynebacterium durum* 検出キットの開発

材料および方法

1. 改良型 *C. durum* 選択培地(Modified-CDSM)と *C. durum* 検出キットの開発

C. durum は galactose 分解能を有する²¹⁾。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。本改良型 *C. durum* 選択培地を Modified-CDSM と命名した。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た。phosphomycin, colistin, および amphotericin B はオートクレーブ後、培地を 50°C 以下に冷ましてから添加した。

C. durum 検出キットは、直径 90 mm のプラスチックシャーレ（アズノール滅菌シャーレ JP；アズワン株式会社，兵庫，日本）に Modified-CDSM を 12 mL 分注して選択培地を作製し，滅菌した薬さじの柄を用いて縦 20 mm，横 15 mm の長方形に切り出したもの（検出面）を，Amicon® Ultra（メルク株式会社，東京，日本）の内筒に設置し作製した。PISFs を #40 滅菌ペーパーポイントにて採取し，検出面全体に PISFs を塗布した。Amicon® Ultra の外筒底部に保湿用に水分を含ませた紙（キムワイプ S-200；日本製紙クレシア株式会社，東京，日本）を置き，内筒を外筒に戻し 37°C，72 時間，5%CO₂ インキュベーターにて好気培養を行った（図 6）。培養後，pH 指示薬による色調変化により判定を行った。既知の菌数に調整した *C. durum* 認定株 ATCC 33449 を検出面に塗抹・培養し，経時的に色調変化を観察することによって基準値の設定を試みた。

2. Modified-CDSM における *C. durum* の回収率

BHI 液体培地にて 37°C, 24 時間, 5%CO₂ インキュベーターによる好気培養にて前培養した *C. durum* 菌液を 0.9 mL の PBS (0.01M, pH7.2) にて 10 倍段階希釈し, その菌液 100 μL を CDSM と Modified-CDSM に塗布し 37°C, 72 時間, 5%CO₂ インキュベーターによる好気培養にて培養を行った。培養後, CDSM と Modified-CDSM 上に形成された集落数から各々の CFU を算定し, *C. durum* の回収率を求めた。なお, 菌種の特異性は, 本研究で開発した口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種の菌種特異的プライマーを用いた Multiplex PCR 法により行った。

3. 試料採取と検出キットおよび Modified-CDSM への接種・培養

対象者は, インプラント周囲溝深さが 3 mm 以内でエックス線画像および肉眼的に異常所見が認められない者を健康なインプラント周囲組織をもつ健常者(インプラント健常群, 60 名), インプラント周囲溝深さが 4 mm 以内で肉眼的に発赤, 腫脹, プロービング時の出血を認めるがエックス線画像にて骨吸収を認めないものをインプラント周囲粘膜炎群 (30 名), インプラント周囲溝深さが 5 mm 以上, プロービング時の出血, インプラント周囲溝からの排膿, エックス線画像にて進行性の骨吸収を認める者をインプラント周囲炎群 (30 名) と分類して分類された。さらに, インプラント周囲粘膜炎群とインプラント周囲炎群を合わせてインプラント周囲疾患群とした²⁰⁾。

各被験者の対象部位に # 40 滅菌ペーパーポイント を 2 本, 10 秒間挿入することによって PISFs 試料を採取した。その後, ペーパーポイント 1 本を本研究で開発した *C. durum* 検出キットへ使用し, 37°C, 72 時間, 5%CO₂ インキュベーターによる好気培養を行った。一方で, もう 1 本のペーパーポイントを 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) を含んだ滅菌チューブに保管し, 氷冷中しながら 20 秒間超音波処理を行い分散し, これを培養試料とした。10 倍段階希釈し, Modified-CDSM に播種後, 37°C, 72 時間, 5%CO₂ インキュベーターによる好気

培養を行った。培養後，培地上に形成した集落数を数えることにより CFU を算出した。各被験者群の結果を比較するために，Kruskal-Wallis 検定にて 3 群間の有意差を確認し，有意差を認めた場合には Dann-Bonferroni 検定を行うこととした。

4. 検出キットにおける有用性の確認

本研究で開発した検出キットの有用性は，インプラント健常群とインプラント周囲疾患群における感度，特異度，有効度，陽性反応的中度，及び陰性反応的中度を算出して検討を行った。また，検出キットの使用期限を調査するために，検出キットの作製日から 1 日，1 週間，1 か月，および 2 か月経過時での本キットにおける検出精度を確認した。

結果

1. Modified-CDSM における *C. durum* の回収率

表 3 に Modified-CDSM 上における *C. durum* の回収率を示す。Modified-CDSM における *C. durum* の回収率は，平均 98.9%であった。一方，同属菌で口腔常在細菌である *C. matruchotii* は全く発育を示さなかった。培養 72 時間後，Modified-CDSM 上における *C. durum* の集落の大きさは 1-2 mm 程度で，境界が明瞭な円形状で黄色のスムーズコロニー，又はラフコロニーを呈した。

2. 開発した検出キットの基準値の設定

既知の菌数に調整した *C. durum* 懸濁液を接種後，72 時間経過時の検出キットの色調変化を図 7 に示す。72 時間後，*C. durum* を接種した検出キットは 1×10^2 CFU 以上で紫色から黄色に変化したのに対し， 1×10^2 CFU 未満では色調変化は認めなかった。前述の結果によると，全てのインプラント周囲炎患者の PISFs 試料中に

における *C. durum* 数は 1×10^2 CFU/ml 以上であったため、本検出キットでは 72 時間の培養で、黄色に変化した PISFs 試料は陽性と判定した。

3. Modified-CDSM を用いた PISFs 試料中における *C. durum* の検出状況

被験者の臨床パラメーターおよび *C. durum* の検出頻度を表 4 に示す。インプラント健常群における *C. durum* 検出頻度は 56.7%であったのに対し、インプラント周囲粘膜炎群とインプラント周囲炎群では全ての被験者から検出された。インプラント健常群における *C. durum* 数は平均 3.10×10 (range: $0 - 2.0 \times 10^2$) CFU であったのに対し、インプラント周囲粘膜炎群では平均 2.09×10^4 (range: $4.8 \times 10 - 4.47 \times 10^4$) CFU, またインプラント周囲炎群では平均 3.53×10^4 (range: $2.0 \times 10 - 7.71 \times 10^4$) CFU であった。以上のことより、健常群と比較してインプラント周囲粘膜炎群とインプラント周囲炎群では有意に *C. durum* 数の増加傾向を認めた ($p < 0.05$)。しかし、インプラント周囲粘膜炎群とインプラント周囲炎群における *C. durum* 数の間には有意差を認めなかった。なお、本研究で開発した Modified-CDSM 上に形成された集落を無作為に釣菌し、Multiplex PCR 法で菌種同定を行ったところ、全て *C. durum* であることが確認された。

4. 検出キットの有用性

本検出キットを用いて、インプラント健常者に対して検査した結果、58 名が陰性と判定された。一方、インプラント周囲疾患群の被験者に対しては、57 名が陽性を示した (表 5)。検出キットにおける有用性は、感度 95.0, 特異度 96.7, 有効度 0.96, 陽性反応的中度 96.6, および陰性反応的中度 95.1 であった (表 6)。さらに、検出キットの保存期間について調査した結果、2 か月経過後もキットの検出精度が劣らないことが確認されたため、少なくとも作製後 2 か月程度は高精度で使用可能であると判断された。

考 察

本研究では、主要な口腔常在細菌である *C. durum* と *C. matruchotii*、また口腔に近接している咽頭部において常在している *C. pseudodiphtheriticum*, *C. coyleae*, *C. xerosis*、さらに上気道に感染し重篤な感染症であるジフテリア症を発症させる *C. diphtheriae* を含む 6 菌種を口腔関連 *Corynebacterium* 属と定義した。そして 6 菌種の中で、Shiba らがインプラント周囲炎細菌叢の中核を担う細菌と報告した *C. durum* に着目し、本菌を検出・定量可能な CDSM を開発した。OCM に NaF と colistin を添加した CDSM 上では、NaF に感受性を示す *C. matruchotii* の発育を認めなかった。一方で、NaF に対して非感受性である *C. coyleae* と *C. diphtheriae* は、CDSM 上で良好な発育を許した。次に、口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種を対象とした Multiplex PCR 法の開発を行った。本方法は一つの PCR チューブの反応で、6 菌種を明確に菌種判別することが可能であった。本研究で開発した CDSM 上に PISFs を接種し、培養後形成された集落を無作為に釣菌し、本 Multiplex PCR 法で菌種同定を行ったところ、全て *C. durum* であった。そのため、PISFs 試料中には *C. coyleae* と *C. diphtheriae* は生息していないことが示された。

開発した CDSM を用いて、インプラント周囲炎患者と健常者の PISFs 中の *C. durum* 数を比較検討したところ、インプラント周囲炎患者で本菌が有意に多く検出された。このことから、Shiba ら¹⁶⁾ が報告したのと同様に本菌はインプラント周囲炎細菌叢において、特異的な細菌であることが示唆された。

歯周炎局所では、嫌気状態、血液の供給といった *P. gingivalis* などの歯周病原細菌に適した環境が整い、それらの増殖が促進される^{22~24)}。同様にインプラント周囲炎局所では、周囲組織に炎症が生じているために易出血性であり、また周囲組織の破壊によって深い周囲溝が形成されるため嫌気度が高くなる。そこで本研究では、血液が及ぼす *C. durum* と *C. matruchotii* における発育の相違を *in vitro* 実験にて、比較検討を行った。*C. durum* は発育に酸素を要求するが、血液を供給

することによって嫌気条件下でも本菌は良好な発育・増殖を示した。一方、同様な条件下でも *C. matruchotii* は良好な発育を示さなかった。そのため、嫌気的かつ血液で満たされた環境であるインプラント周囲炎局所において、*C. durum* が優勢であることが考えられた。

次に、*C. durum* 選択培地 CDSM に改良を加えることで Modified-CDSM を作製し、本選択培地の組成を用いて *C. durum* 検出キットの開発を行った。Modified-CDSM では NaF 量を減ずることにより、*C. durum* の発育を促進させた。また、口腔関連 *Corynebacterium* 属 6 菌種の中で、*C. durum* は galactose 分解能を有するため、Modified-CDSM では炭素源として sucrose から galactose に変更した²¹⁾。さらに、*C. durum* が galactose を分解して酸を産生した結果、培地中における pH の低下が生じることに着目し、培地色が紫色から黄色へ色調変化が生じるよう galactose と pH 指示薬の bromocresol purple を添加した。Modified-CDSM に試料を播種・培養後、48 時間経過した時点で良好な発育が認められるが、より明瞭な培地の色調変化をもたらすために培養時間を 72 時間と設定した。本研究で開発した Modified-CDSM を用いて PISFs 中の *C. durum* 数の比較検討を行ったところ、インプラント健常群とインプラント周囲粘膜炎群、またインプラント健常群とインプラント周囲炎群間では有意差を認めたが、インプラント周囲粘膜炎群とインプラント周囲炎群間では有意差を認めなかった。そのため、*C. durum* はインプラント周囲炎の前段階の病態であるインプラント周囲粘膜炎の段階で増加している傾向にあると考えられた。本研究では *C. durum* のみに着目したが、インプラント周囲炎は複合感染症かつ多因子疾患であるため²⁵⁾、インプラント周囲溝細菌叢の詳細な検討が今後必要である。

本検出キットは、高い感度、特異度、有効度、陽性反応的中度、および陰性反応的中度を示したため、インプラント周囲疾患の病態把握に有用であることが示された。インプラント健常群で陽性を示した 2 名は、試料採取時においてインプ

ラント周囲粘膜炎に罹患しかけていた可能性もあるために、今後、本検出キットを用いて病態推移を観察すべきと考えている。また、インプラント周囲疾患群で本検出キットが陰性となった3名は、患者自身による直前の洗口液の使用や入念な口腔内清掃により菌数が減少した可能性があると考えられた。今後、本検出キットを臨床応用するために、被験者属性（年齢、性別、全身疾患、喫煙歴など）、口腔内状況（口腔衛生状態、残存歯数、歯周炎罹患度など）、およびインプラント関連項目（インプラントシステム、埋入深度など）等、様々な交絡因子を調整して、詳細に検討する必要があると考えられる。

結論

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* はインプラント健常群と比較してインプラント周囲疾患において有意に多く検出された。
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有用であることが示された。

参考文献

- 1) Brånemark PI, Adell R, Breine U, et al.: Intra-osseous anchorage of dental prostheses I. Experimental studies, *Scand J Plast Reconstr Surg*, 3: 81-100, 1969.
- 2) Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, et al.: Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period, *Scand J Plast Reconstr Surg*, 16: 1-132, 1977.
- 3) Derks J, Tomasi C : Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology, *J Clin Periodontol*, 42: S158-S171, 2015.
- 4) Ogata Y, Nakayama Y, Tatsumi J, et al.: Prevalence and risk factors for peri-implant diseases in Japanese adult dental patients, *J Oral Sci*, 59: 1-11, 2017.
- 5) Zitzmann NU, Berglundh T, Marinello CP, et al.: Experimental peri-implant mucositis in man, *J Clin Periodontol*, 28: 517-523, 2001.
- 6) Carcuac O, Berglundh T: Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions, *J Dent Res*, 93: 1083-1088, 2014.
- 7) Charalampakis G, Rabe P, Leonhardt Å, et al.: A follow - up study of peri - implantitis cases after treatment, *J periodontol*, 38: 864-871, 2011.
- 8) de Waal YC, Raghoobar GM, Meijer HJ, et al.: Prognostic indicators for surgical peri - implantitis treatment, *Clin Oral Implants Res*, 27: 1485-1491, 2016.
- 9) Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV: Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review, *Eur J Oral Implantol*, 5: S21-S41, 2012.
- 10) Lang NP, Brägger U, Walther D, et al.: Ligature-induced peri-implant infection

- in cynomolgus monkeys I. Clinical and radiographic findings, *Clin Oral Implants Res*, 4:2-11, 1993.
- 11) Subramani K, Jung RE, Molenberg A, et al.: Biofilm on dental implants: a review of the literature, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24: 616-626, 2009.
 - 12) Charalampakis G, Leonhardt Å, Rabe P, et al.: Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study, *Clin Oral Implants Res*, 23: 1045-1054, 2012.
 - 13) Jankovic S, Aleksic Z, Dimitrijevic B, et al.: Prevalence of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival plaque at peri-implantitis, mucositis and healthy sites. A pilot study, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 40: 271-276, 2011.
 - 14) Rakic M, Grusovin MG, Canullo L: The microbiologic profile associated with peri-implantitis in humans: A systematic review, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 31: 359-368, 2016.
 - 15) Fawaz A.: Role of oral yeasts in the etiopathogenesis of peri-implantitis: An evidence-based literature review of clinical studies, *Arch Oral Biol*, 111: 104650, 2020.
 - 16) Shiba T, Watanabe T, Kachi H, et al.: Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms, *Sci Rep*, 6: 30997. DOI: 10.1038/srep30997, 2016.
 - 17) Schwarz F, Derks J, Monje A, et al.: Peri-implantitis, *J Periodontol*, 89: S267-S290, 2018.
 - 18) 作山 葵, 淵上 慧, 宗像源博, 他 : インプラント周囲細菌叢の比較検討, *日口腔インプラント誌*, 25: 563-564, 2012.
 - 19) Tsuzukibashi O, Uchibori S, Shinozaki-Kuwahara N, et al.: A selective medium

for the isolation of *Corynebacterium* species, J Microbiol Methods, 104: 67-71, 2014.

- 20) Lang NP, Wilson TG, Corbet EF: Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment, Clin Oral Impl Res, 11: 146–155, 2000.
- 21) Riegel P, Heller R, Prevost G, et al.: *Corynebacterium durum* sp. Nov., from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol, 47: 1107-1111, 1997.
- 22) Ikeda E, Shiba T, Ikeda Y, et al.: Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis, Odontology, 108: 280-291, 2020.
- 23) Leonhardt Å, Renvert S, Dahlén G: Microbial findings at failing implants, Clin Oral Implants Res, 10: 339-345, 1999.
- 24) Pye A, Lockhart D, Dawson M, et al.: A review of dental implants and infection, J Hosp Infect, 72: 104-110, 2009.
- 25) Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, et al.: "Peri-Implantitis": A complication of a foreign body or a Man-Made "Disease". facts and fiction, Clin Implant Dent Relat Res, 18: 840-9, 2016.

表1 *Corynebacterium durum* 選択培地 (CDSM) における口腔関連 *Corynebacterium* 属の回収率

菌種	BHI blood	CDSM	回収率 (%)
	CFU/ml × 10 ⁷	CFU/ml × 10 ⁷	
<i>C. durum</i>			
ATCC 33449	3.4±0.3 ^a	3.4±0.3	99.3
NUM-Cd 8002	3.3±0.5	3.2±0.2	97.2
<i>C. matruchotii</i>			
ATCC 14266	1.6	0.0	0.0
NUM-Cm 7503	1.4	0.0	0.0
<i>C. diphtheriae</i>			
JCM 1310	2.0	2.0	98.7
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>			
JCM 11665	1.1	0.0	0.0
<i>C. xerosis</i>			
JCM 1971	1.0	0.0	0.0
<i>C. coyleae</i>			
JCM 10381	2.5	2.4	94.8

^a Average ± SD.

表 2 被験者の臨床パラメーターと *C. durum* の検出頻度

被験者	性別 (男:女)	年齢 (歳)	インプラント周囲溝深さ (mm)	<i>C. durum</i> 検出頻度 (%)
インプラント健常者 (n=20)	(7:13)	53 (range:36-76)	2.35 * (range:2-3)	11 ** (55)
インプラント周囲炎患者 (n=20)	(4:16)	64 (range:43-82)	7.85 * (range:5-11)	20 ** (100)

* $p < 0.05$ (Student t-test)

** $p < 0.01$ (Chi-square test)

表3 Modified-CDSM 上における *C. durum* の回収率

菌株		CDSM CFU/ml, $\times 10^7$	Modified-CDSM CFU/ml, $\times 10^7$	回収率 (%)
<i>C. durum</i>				
認定株	ATCC 33449	3.4 ± 0.3^a	3.4 ± 0.5^a	99.7%
分離株	NUM-Cd 8002	3.3 ± 0.5^a	3.2 ± 0.4^a	98.1%

^a Average \pm SD.

表 4 被験者の臨床パラメーターおよび *C. durum* の検出頻度

被験者	性別 (男:女)	年齢 (歳)	インプラント周囲溝 深さ(mm)	<i>C. durum</i> 検出者数 (検出頻度: %)	Modified-CDSM を用いた <i>C. durum</i> 数 mean (±SD) (CFU/ml)
インプラント健常群 (n=60)	(24:36)	64 (range:21-86)	2.35 (range: 2-3)	34 (56.7)	3.10×10 ⁴ (±4.24×10)
インプラント周囲粘膜炎群 (n=30)	(14:16)	63 (range:30-88)	3.36 (range:2~4)	30 (100)	2.09×10 ⁴ (±1.37×10 ⁴)*
インプラント周囲炎群 (n=30)	(12:18)	68 (range:39-85)	6.3 (range: 5-8)	30 (100)	3.53×10 ⁴ (±1.50×10 ⁴)*

*インプラント健常群と比較し有意差 ($p < 0.05$)

表5 *C. durum* 検出キットによる判定結果

被験者	判定 (+)	判定 (-)
インプラント健常群 (n=60)	2	58
インプラント周囲粘膜炎群 (n=30)	28	2
インプラント周囲炎群 (n=30)	29	1

表6 *C. durum* 検出キットの有用性の検討

		周囲疾患 (粘膜炎・周囲炎)		感度	特異度	有効度	陽性反応 的中度	陰性反応 的中度
		有	無					
		検出キット	陽性					
	陰性	3	58					

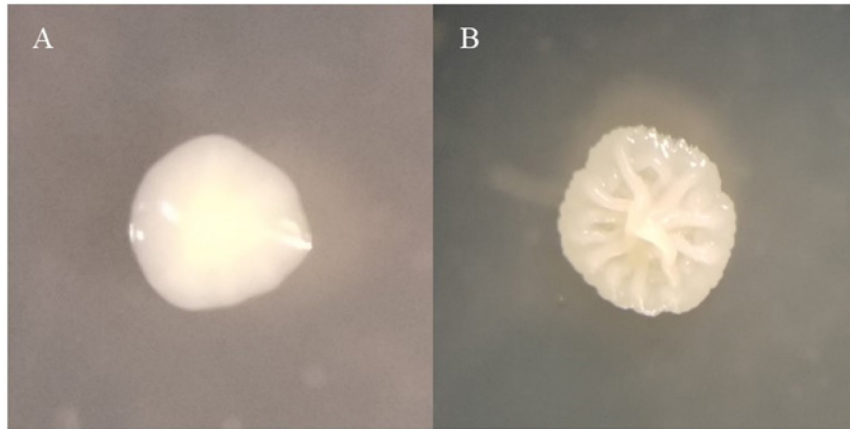
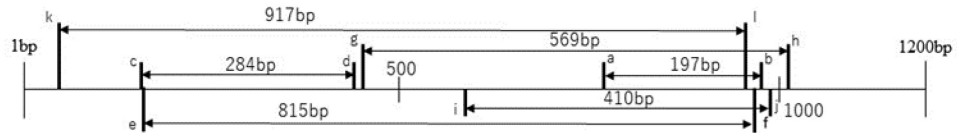
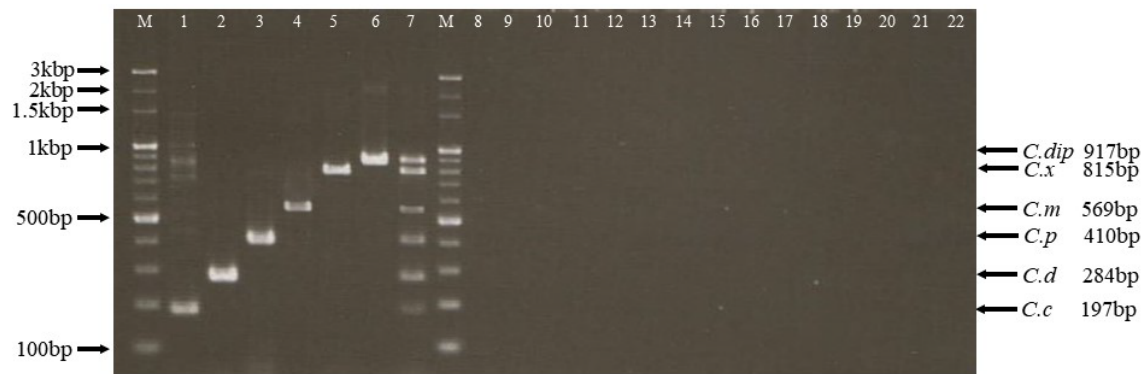


図1 CDSM 上の *C. durum* の集落像
A: スムースコロニー
B: ラフコロニー



a: Forward primer for <i>Corynebacterium coyleae</i> CeF : <u>AGTCCCTTCCACGGGGTTC</u> 784-802bp <i>C. coyleae</i> AG-TCCCT-TCCACGGGGTTC <i>C. durum</i> GGCTGTGTGTTTCAG--TCT <i>C. pseudodiphtheriticum</i> GG-GAUCT-TTGGGGTTTCT <i>C. matruchotii</i> GG-GAOCGGTTT--GGTTTCN <i>C. xerosis</i> GG-GGTCT-TCCACGACTTCT <i>C. diphtheriae</i> AG-GGTCT-TCCACGACTTTC		e: Forward primer for <i>Corynebacterium xerosis</i> CxF : <u>GCACCGTGAGGGTGTGGT</u> 156-173bp <i>C. coyleae</i> ACTTCTTGAGGTT-GTGCT <i>C. durum</i> ATGGCGTAGGGTC-ATGCT <i>C. pseudodiphtheriticum</i> ATGCTTTAGTGTGT-GTGGT <i>C. matruchotii</i> ATGGTTTAGTGTCTCATGCT <i>C. xerosis</i> GCACCGT-GAGGGT-GTGGT <i>C. diphtheriae</i> ATGCTTTAGTGTGT-GTGGT		i: Forward primer for <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> CpF : <u>ACAGCTTAACTGTGGGCG</u> 581-598bp <i>C. coyleae</i> GCAGCTTAACTGGGGAC <i>C. durum</i> GGGCTTAACTGGGGCG <i>C. pseudodiphtheriticum</i> <u>ACAGCTTAACTGTGGGCG</u> <i>C. matruchotii</i> GNGCTTAACTGGGGT <i>C. xerosis</i> GGGCTTAACTGGGGCG <i>C. diphtheriae</i> GGGCTTAACTGGGGCG	
b: Reverse primer for <i>Corynebacterium coyleae</i> CeR : <u>AAAGGGAAAGCGCATCTCAG</u> 981-962bp <i>C. coyleae</i> <u>AAAGGGAAA-GCCATCTCAN</u> <i>C. durum</i> -AAGGGAGG-ACGTATCTCTA <i>C. pseudodiphtheriticum</i> -AAGGGAAA-CTACATCTCTG <i>C. matruchotii</i> -AAGGGAGGTACGTATCTCTA <i>C. xerosis</i> -AAGCGAAG-GACCATCTCTG <i>C. diphtheriae</i> -AAGGGAAG-GACCATCTCTA		f: Reverse primer for <i>Corynebacterium xerosis</i> CxR : <u>GACCATCTCTGGCCCGTCCC</u> 970-950bp <i>C. coyleae</i> GCGCATCTCTNCGATCTG <i>C. durum</i> ACGTATCTCTAOCGATCTG <i>C. pseudodiphtheriticum</i> CTACATCTCTGCAGGATCCA <i>C. matruchotii</i> CTACATCTCTGCAGGATCCA <i>C. xerosis</i> GACCATCTCTGGCCCGTCCC <i>C. diphtheriae</i> ACGTATCTCTAOCGATCTG		j: Reverse primer for <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> CpR : <u>CTACATCTCTGCAGCGATCCA</u> 990-970bp <i>C. coyleae</i> GCGCATCTCTNCGATCTG <i>C. durum</i> ACGTATCTCTAOCGATCTG <i>C. pseudodiphtheriticum</i> <u>CTACATCTCTGCAGGATCCA</u> <i>C. matruchotii</i> ACGTATCTCTAOCGATCTG <i>C. xerosis</i> GACCATCTCTGGCCCGTCCC <i>C. diphtheriae</i> ACGTATCTCTAOCGATCTG	
c: Forward primer for <i>Corynebacterium durum</i> CdF : <u>ACATACGACCATGGCGTAGG</u> 156-175bp <i>C. coyleae</i> GGATAGCAACCTTCTTGGG <i>C. durum</i> <u>ACATACGACCATGGCGTAGG</u> <i>C. pseudodiphtheriticum</i> GGATAGCAACATGCTTTAGT <i>C. matruchotii</i> GGATAGCAACATGCTTTAGT <i>C. xerosis</i> GGATAGCAACATGCTTTAGT <i>C. diphtheriae</i> GGATAGCAACATGCTTTAGT		g: Forward primer for <i>Corynebacterium matruchotii</i> CmF : <u>IGGIGACGGTACCTTTGTTA</u> 447-466bp <i>C. coyleae</i> CC-TA-----GAGA <i>C. durum</i> COGTG-----GAGA <i>C. pseudodiphtheriticum</i> CC-TG-----GAGA <i>C. matruchotii</i> <u>IGGIGACGGTACCTTTGTTA</u> <i>C. xerosis</i> GA-TG-----GAGA <i>C. diphtheriae</i> CC-TA-----GATA		k: Forward primer for <i>Corynebacterium diphtheriae</i> CdipF : <u>GCCTAGCTTCTAGGTAC</u> 46-63bp <i>C. coyleae</i> GC--CT--CNGCTTGCANG--GGTAC <i>C. durum</i> CC--CTGCCAOCCTTGGTGGGTAC <i>C. pseudodiphtheriticum</i> GC--CT--CIT--CGGA--GGTAC <i>C. matruchotii</i> GCCCCACTTTTTTGGTGG--GGTCC <i>C. xerosis</i> GC--CC--CAGCTTGTCTG--GGTAC <i>C. diphtheriae</i> <u>GC--CT--AGCTTGC-TA--GGTAC</u>	
d: Reverse primer for <i>Corynebacterium durum</i> CdR : <u>AGGTGGGCTTCGTCCCGG</u> 439-422bp <i>C. coyleae</i> -----GCTTCGTCCTA <i>C. durum</i> <u>AGGTGGGCTTCGTCCCGG</u> <i>C. pseudodiphtheriticum</i> -----OCTTCGTCCTG <i>C. matruchotii</i> -----NCTTCGTCCTA <i>C. xerosis</i> -----OCTTCGTCGATG <i>C. diphtheriae</i> -----GCTTCGTCCTA		h: Reverse primer for <i>Corynebacterium matruchotii</i> CmR : <u>ACCGTCCCCACACTAA</u> 1015-995bp <i>C. coyleae</i> TACACCAACACAAAGGGAAA <i>C. durum</i> TGCACCAACAC--AAGGGAGG-- <i>C. pseudodiphtheriticum</i> TACACTAGCAC--AAGGGAAA-- <i>C. matruchotii</i> <u>CACACCAACAC--AAGGGAGGCT</u> <i>C. xerosis</i> TATACGAGCAC--AAGGGAGG-- <i>C. diphtheriae</i> TATACGAGCAC--AAGGGAAA--		l: Reverse primer for <i>Corynebacterium diphtheriae</i> CdipR : <u>ACTACGGCATCTCTCAT</u> 962-945bp <i>C. coyleae</i> TCTNCGATCTCTGCTGT <i>C. durum</i> TCTACGGCATCTGCTGT <i>C. pseudodiphtheriticum</i> TCTGCAGGATCCAGTGT <i>C. matruchotii</i> TCTACGACCTCTGCTGT <i>C. xerosis</i> TCTGGCCGGTCCGATAT <i>C. diphtheriae</i> <u>ACTACGGCATCTCTCAT</u>	

図2 口腔関連 *Corynebacterium* 属菌の 16S rDNA に基づいて設計した菌種特異的プライマーの領域と塩基配列



The primer mixture contained CcF, CcR, CdF, CdR, CpF, CpR, CmF, CmR, CxF, CxR, CdipF and CdipR. Lanes: 1, *Corynebacterium coyleae* JCM 10381; 2, *C. durum* ATCC 33449; 3, *C. pseudodiphtheriticum* JCM11665; 4, *C. matruchotii* ATCC 14266; 5, *C. xerosis* JCM1971 and 6, *C. diphtheriae* JCM 1310; 7, Mixture of *Corynebacterium coyleae* JCM 10381, *C. durum* ATCC 33449, *C. pseudodiphtheriticum* JCM11665, *C. matruchotii* ATCC 14266, *C. xerosis* JCM1971, *C. diphtheriae* JCM 1310; 8, *Streptococcus mitis* ATCC 49456; 9, *S. goldonii* ATCC 10558; 10, *S. oralis* ATCC 10557; 11, *S. sanguinis* ATCC 10556; 12, *S. salivarius* JCM 5707; 13, *S. anginosus* ATCC 33397; 14, *S. mutans* NCTC 10449; 15, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104; 16, *A. oris* ATCC 27044; 17, *A. odontolyticus* ATCC17929; 18, *A. israelii* ATCC 12102; 19, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586; 20, *Veillonella parvula* JCM 12972; 21, *Neisseria sicca* ATCC 29256; 22, *Rothia dentocariosa* JCM 3067; M, molecular size marker (100-bp DNA ladder).

図3 Multiplex PCR 法における口腔関連 *Corynebacterium* 属の同定

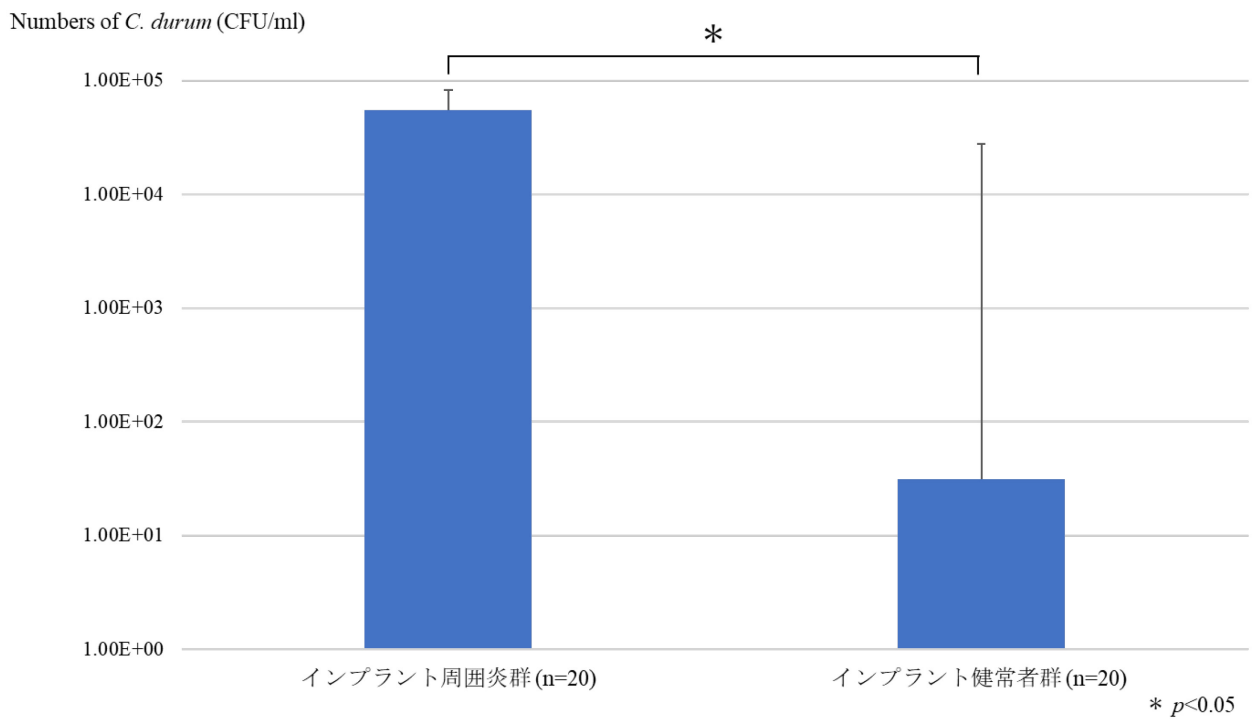


図 4 インプラント周囲炎群およびインプラント健常者群におけるインプラント周囲溝滲出液中の *C. durum* 数の比較

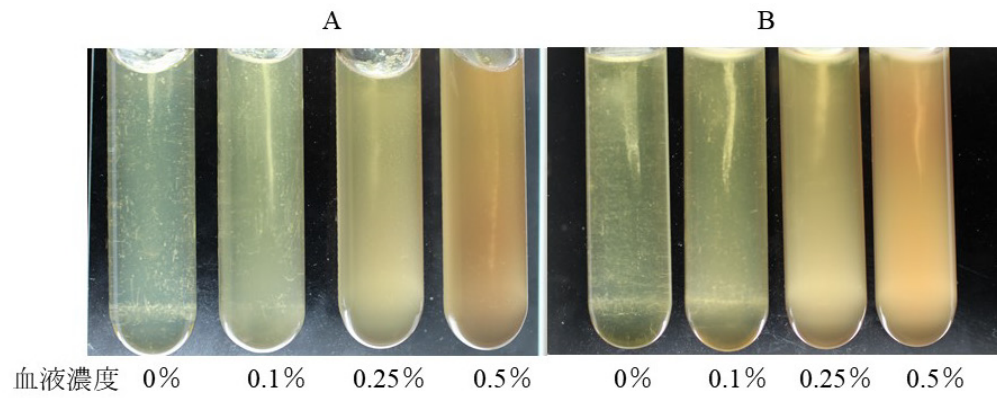


図5 *C. durum* と *C. matruchotii* における血液濃度別発育・増殖の結果
A: *C. durum*
B: *C. matruchotii*



図 6 *C. durum* 検出キットの概要

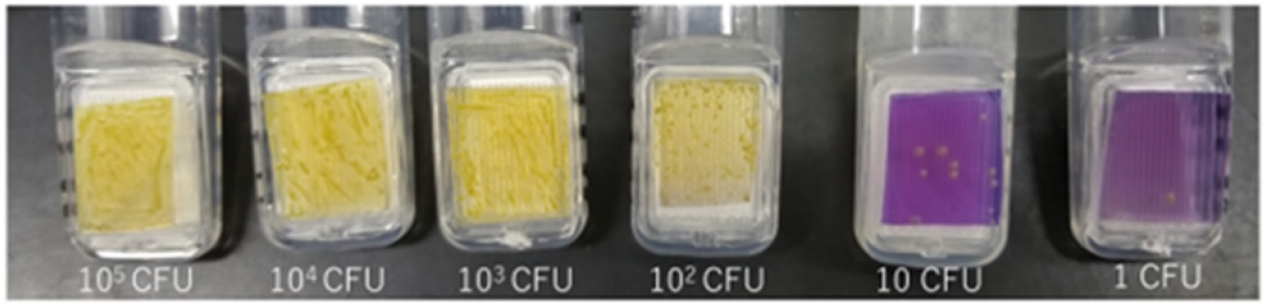


図7 *C. durum* 検出キットの判定基準