

論文審査の結果の要旨

氏名：鈴木 秀 紀

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Health indicator bacteria that is useful for risk assessment of peri-implantitis

（インプラント周囲炎のリスク評価に有用な健康指標となる細菌）

審査委員：（主 査） 教授 泉福 英信

（副 査） 教授 河相 安彦

（副 査） 教授 福本 雅彦

本研究は、口腔常在菌である *Rothia* 属菌の高精度かつ簡易な菌種の分離・同定法の確立し、その *Rothia* 属菌がインプラント周囲組織のリスク評価に有用な細菌となり得るかの検索を行ったものである。

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。そのような中、インプラント治療においては、*Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原細菌を定性または定量的に調べる細菌検査が現在も活用されている。しかしながら、健全なインプラント周囲組織においても歯周病原細菌が検出される場合や、細菌検査の結果と実際の臨床所見が一致しない症例も多く、現在の細菌検査の臨床的意義に疑問を持つ声も多い。そのため、本論文の著者は Red complex 細菌を病的指標として評価する検査に疑義を抱き、現行の検査とは対照的に健全なインプラント周囲組織状態を反映する細菌群に着目し、それらを健全マーカーとした新しい細菌学的検査のシステム構築するという着想に至った。そこで、健全マーカーとなり得る細菌の検索を行い、口腔常在菌の *Rothia* 属がその候補となった。本研究は、Multiplex PCR 法を用いた口腔 *Rothia* 属菌の簡易かつ精度の高い新しい同定・検出法を確立し、本菌属がインプラント周囲炎のリスク判定に有用な健全マーカーとなり得るか否かを詳細に調査することを目的としている。また、*Rothia* 属菌の最適な生育環境を確認するために、*in vitro* 実験にて本属菌の酸素要求性についても検討した。さらには、歯周病に最も関与する細菌グループである Red complex と本疾患との関連性についても調査を行った。

初めに、口腔 *Rothia* 属 3 菌種を簡易かつ正確に同定・検出することが可能な Multiplex PCR 法の確立を試み、そのための *Rothia* 属菌特異的 Primer は、16S rDNA に基づいて設計している。本方法は、3 菌種を正確に検出可能であり、3 菌種が試料中に混在していても正確な検出・判別を可能にしている。また、代表的な口腔細菌に対しては全く反応していない。この結果から、本方法は口腔 *Rothia* 属 3 菌種を同定・検出するのに有用であると判断できた。また、本方法による同定と検出方法は、DNA 抽出作業が不要であり、試料採取から結果が得られるまでに要する時間が約 90 分と簡易性に優れていて、高精度かつ迅速に結果が得られる有用な手法であると推察された。

次に、インプラント健全群（NPI）30 名とインプラント周囲炎群（PI）30 名からインプラント周囲溝滲出液を採取し、口腔 *Rothia* 属菌選択培地である ORSM に播種・培養を行い、両群における口腔 *Rothia* 属 3 菌種の検出頻度を調査した。その結果、総細菌数、*Rothia dentocariosa* 数および *Rothia mucilaginosa* 数は、両群間で有意差を認めなかったが、NPI における *Rothia aeria* 数は PI と比較して有意な増加を認めた。また、総細菌数に占める口腔 *Rothia* 属菌の割合は NPI において 3 菌種共に高い傾向を示し、特に *R. aeria* は PI と比較して約 100 倍もの高い割合を示している。

また、好気培養と嫌気培養での異なる培養条件での *R. aeria* 認定株と分離株の発育・増殖を比較検討した結果、*R. aeria* 認定株と分離株共に好気培養を行った方が顕著に良好な発育・増殖を認めた。次に、半流動培地を用いて、*R. aeria* と偏性嫌気性菌の *P. gingivalis* における発育の違いを *in vitro* にて調査し、*R. aeria* は酸素濃度が高い上層部だけに顕著な発育・増殖を認めたのに対し、嫌気性菌の *P. gingivalis* は、酸素濃度が高い上層部での発育・増殖は認めず、酸素濃度が低い中層部から下層部までの発育・増殖を認めた。以上のことから、浅い健全なインプラント周囲溝は好氣的、すなわち酸素濃度が高いために *R. aeria* にとって好ましい生育環境であるのに対し、本疾患における深い周囲溝は嫌氣的、すなわち酸素濃度が低いために *R. aeria* にとっては好ましくなく、*P. gingivalis* などの偏性嫌気性菌が爆発的に増加する要因となることを推察している。

さらに、PCR法を用いてNPIとPIにおけるRed complex 3菌種の検出頻度を比較検討を行った。PIで3菌種共に高頻度で検出される一方で、NPIにおいても3菌種は少なからず検出される結果を得ている。以上のことから、Red complexはPIで有意に検出されるが、全PI患者から検出されるわけではなく、またNPIでも検出されることを鑑みると、臨床の場で現在実施しているRed complexの定性・定量検査は、本疾患の詳細なリスク判定や的確な病態把握などの指標として十分ではないと考えられた。

以上のことから本論文は下記の結論を得た。

1. 本研究で確立したMultiplex PCR法は、*Rothia*属菌の同定・検出方法として簡易性に優れ、高精度かつ迅速な結果が得られる有用な手法であることが推察された。
2. 本研究において、総細菌数に占める口腔*Rothia*属菌の割合はNPIにおいて3菌種共に高い傾向を示し、特に*R. aeria*はPIと比較して約100倍もの高い割合を示した。
3. 本研究において、*R. aeria*の生育には好気的で浅い健常インプラント周囲溝が適しており、嫌気的で深い周囲溝は適していないことが推察された。

これらの研究成果は、インプラント周囲疾患のリスク判定や的確な病態把握のスクリーニング検査における解明の新たな知見を得たものであり、今後の歯科医学ならびに歯科臨床検査医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

令和 3年 11月 18日