

があまりにも高いため、歯周炎などのいわゆるsub-clinicalな炎症の影響をマスクしたものと考えられる。我々は別の研究（2-3ページ）から、2型糖尿病患者の歯周病細菌に対する血清抗体価とhs-CRPが有意に相関することを報告した。この研究における対象患者は比較的血糖コントロールが良好で、BMIがmid-rangeであり（ $20.0 \leq \text{BMI} < 27.0 \text{ kg/m}^2$ ）、心臓血管疾患、虚血性発作、肝障害、腎不全の既往がなく、さらに著しい糖尿病性合併症を有していない患者群であった。本研究に用いた患者群は、糖尿病性合併症を有する者が約45%を占めていること、またインスリン治療を約40%の者が受けており、高血圧や脂質代謝異常を有する患者がいたこと、また過去に動脈硬化・脳梗塞・心筋梗塞の既往を有している患者が含まれていたため、このような弱い相関となった可能性が考えられる。よって今後、患者層を詳細に絞ったより介入した研究が必要となるとともに、他の危険因子の候補（肝炎ウイルスに対する抗体、クラミジア等）も検討に入れて考察する必要がある。また、CRP値のみでなく、TNF- α やアディポネクチンと歯周感染との関連性も検討する必要がある。

J. まとめ

動脈硬化発症予測因子hs-CRP値と歯周病細菌(*P. gingivalis*)に対する血清抗体価との関連はGroup3患者群(25<BMI<30)において有意に正の相関を示した。しかし、全患者群で検討した場合hs-CRPと歯周病細菌に対する血清抗体価との関連はなかった。この原因としてCRP上昇に關与する他の因子の干渉が考えられた。

K. 論文発表

1. Nishimura F, Taniguchi A, Iwamoto Y, Soga Y, Fukushima M, Nagasaka S, Nakai Y, Murayama Y. *Porphyromonas gingivalis* infection is associated with elevated C-reactive protein in nonobese Japanese type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2002 Oct;25(10):1888.
2. Nishimura F, Iwamoto Y, Mineshiba J, Shimizu A, Soga Y, Murayama Y. Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor-alpha in a 2-way relationship. *J Periodontol*. 2003 Jan;74(1):97-102.
3. Taniguchi A, Nishimura F, Murayama Y, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Yoshii S, Kuroe A, Suzuki H, Iwamoto Y, Soga Y, Okumura T, Ogura M, Yamada Y, Seino Y, Nakai Y. *Porphyromonas gingivalis* infection is associated with carotid atherosclerosis in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism*. 2003 Feb;52(2):142-5.

Table 1**被験者のプロフィール**

Parameter	means±SD.
n	129
male/female	66/63
Diabetic complication	56/129 (43.4%)
Insulin treatment	50/129 (38.8%)
age (yr)	62.06±10.17
BMI (kg/m²)	23.44±3.79
HbA1c (%)	6.68±1.33
T-CHOL (mg/dl)	198.73±29.88
TG (mg/dl)	121.20±62.73
HDL-CHOL (mg/dl)	61.91±16.73
LDL-CHOL (mg/dl)	115.95±24.08

Table 2 **各検査項目とhs-CRPとの関係**

variable	r	P value
BMI	0.274	0.0006*
Pg FDC381	0.022	0.78
Pg SU63	0.033	0.68
T-CHOL	0.55	0.55
TG	0.303	0.3
HDL-CHOL	-0.148	0.093
LDL-CHOL	0.16	0.06

*:p<0.001

各検査項目とBMIとの関係

variable	r	P value
hs-CRP	0.274	0.0006*
Pg FDC381	-	-
Pg SU63	-	-
T-CHOL	-0.38	0.668
TG	0.354	0.0001**
HDL-CHOL	-0.148	0.0086***
LDL-CHOL	0.16	0.937

*:p<0.001

** :p<0.0001

***:p<0.01

Table 3 患者群をBMIを用いて4群に分類

Group 1: BMI <18.6

Group 2: $18.6 \leq$ BMI <25.0

Group 3: $25.0 \leq$ BMI <30

Group 4: $30.0 \leq$ BMI

Group 1とhs-CRPとの関係

variable	r	P value
Pg FDC381	0.321	0.335
Pg SU63	0.273	0.413

Group 2とhs-CRPとの関係

variable	r	P value
Pg FDC381	-0.248	0.248
Pg SU63	-0.072	0.469

Group 3とhs-CRPとの関係

variable	r	P value
Pg FDC381	0.360	0.030**
Pg SU63	0.273	0.048***

Group 4とhs-CRPとの関係

variable	r	P value
Pg FDC381	-0.405	0.284
Pg SU63	-0.500	0.185

**: $p < 0.03$

***: $p < 0.05$

A. 宛名：分担研究者 花田信弘 殿

B. 指定課題名：平成14年度医療技術評価総合研究事業

「高齢者の口腔保健と全身的な健康状態の関係についての総合研究」

C. 研究協力課題名：「口腔バイオフィルムとしてのNanobacteriaの病原的意義に関する研究」

D. 研究協力者：

公文裕巳（岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 教授）

狩山玲子（岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 助手）

泉福英信（国立感染症研究所細菌第一部・室長）

E. 背景

フィンランドKupio大学の研究者グループ（中心人物はトルコ出身の女性研究者 Ciftcioglu、現在はNASA）が、従来の細菌に較べて著しく小さい（0.1～0.5 μ m）新種バクテリアNanobacteriaが腎結石の原因微生物となることを1998年に初めて国際誌（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8274, 1998）に報告した。本菌は通常のバイオフィルム形成細菌における菌体外多糖からなる外被の代わりにアパタイトの外被を形成し、その微小コロニーとしてのバイオフィルムそのものが結晶核となり、リン酸Caのみならずリン酸Caを含む全ての腎結石の形成に直接的に関与するという衝撃的な報告につながった（Kidney Int., 56:1893-8, 1999）。その後、彼らのグループからは歯石をはじめとする他の石灰化病変や嚢胞腎の発症にも関与するという報告が続いているものの、他の研究者による追試は全て失敗している（KramerらCurr. Opin. Urol., 10:35-8, 2000）。NIHのCisarらはCiftciogluらが報告したNanobacterium sanguineumの16S rDNAのシーケンスは、Phyllobacterium myrsinacearumの16S rDNAと100%一致し、PCRにおける環境菌のコンタミであることを明らかにするとともにNanobacteriaの存在そのものを否定した（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:11511, 2000）。

岡山大学泌尿器科では本菌の重要性に着目し独自にヒト尿路結石から本菌の分離を試みてきた。2001年1月のウシ胎児血清よりの分離に続き、10月ついにヒト結石より第1株を分離、以後8株の分離に成功している。2001年8月には、Ciftcioglu女史を日本に招聘して情報交換、その後、彼らの作成したモノクローナル抗体の供与を受けて検討した結果、岡山大学で分離した株も特異的に染色された。ヒト腎結石からの分離、組織培養用DMEM培地でアパタイト外被を形成するという性状と特徴的形態、摘出結石断面における培養Nanobacteriaと電顕的には同一と判断される微粒子集塊の存在などから、両者の分離株は同一種の微生物と判断される。

F. 研究の目的：

Nanobacteriaが真に微生物であり生体内で生じる異所性石灰化の原因となるのか否か、特に、細菌バイオフィルムとして本微生物の初期付着・定着として口腔バイオフィルムの果たす役割を検討することである。この最終研究目的を達成するために、本研究では、歯石を中心とする口腔内病変からのNanobacteriaの分離とともに、ヒトの腎結石から分離されたNanobacteriaの分子生物学的ならびに超微形態学的解析とその増殖様式について検討する。

G. 研究計画:

- 1) 歯石からのNanobacteriaの分離: 腎結石と同様に、歯石を粉末化したのち脱灰し、0.45 μm のフィルターを通過後、組織培養用のDMEMで培養した。
- 2) 歯石の電顕観察: 歯石の断面を腎結石と同様に主に走査型電子顕微鏡で観察した。
- 3) Nanobacteriaの性状解析: 分子生物学的解析、超微形態学的観察、高エネルギーX線(Spring8)での解析を含む構造解析など多面的に解析した。

H. 結果および考察:

現在までに検討した10数個の歯石からは、現時点ではNanobacteriaは分離されていない。しかし、腎結石から分離したNanobacteriaの倍化時間は30日以上であり、最初の分離に成功するまでに200日以上を要したことから考えて、さらに培養を継続して判定する必要がある。また、電子顕微鏡による観察においても、腎結石の中心部断面に見出されるアパタイトの外被を有する特徴的形態をしめす粒子は観察されていない。これについても継続して検討する必要がある。

一方、腎結石から分離されたNanobacteriaについては、極めて特徴的な形態を有するバイオフィームが無細胞系でしかも、無血清下でも形成され、しかも、モノクローナル抗体で特異的に染色されることが証明された。しかし、マイコプラズマを含むほとんどの真正細菌の16S rDNAに適合するユニバーサルプライマーを用いて検討したが、現在までのところポジティブな成績は得られていない。現在のユニバーサルプライマーは古細菌と一部の真正細菌には適用できないので、新たなプライマーを設定してさらに検討する必要がある。また、本菌の増殖速度が遅いこととアパタイトの外被をもつことが分子生物学的解析の主たる障壁とも考えられさらなる検討が必要である。

一方、本菌による石灰化が細菌のバイオフィーム形成の一種であると考えられることから、細菌のバイオフィーム形成についても種々の基礎的検討を加えており、以下に示すように一定の成果をあげることができた。

I. 論文発表

1. Araki, M., Kariyama, R., Monden, K., Tsugawa M., Kumon, H. : Molecular epidemiological studies of *Staphylococcus aureus* in urinary tract infection. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 8:168-174, 2002.
2. Monden, K., Ando, E., Iida, M., Kumon, H. : Role of fosfomycin in a synergistic combination with ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 8:218-226, 2002.
3. Nakayama, J., Kariyama, R., Kumon, H. : Description of a 23.9 kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes, which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3152-3155, 2002.
4. 狩山玲子, 公文裕巳: 新世紀の感染症学(下)ーゲノム・グローバル時代の感染症アップデート。IV. 感染症特論 感染症における特殊な病態と対応 バイオフィーム感染症 日本臨床61(増刊3): 266-271, 2003.

J. 学会発表

1. International Conference on Medical Biofilm 2002 Tokyo, Japan, 2002, 3, 17-19

“Key-Note-Lecture: Biofilm infections in the urinary tract” Kumon H.

2. ASM Conference on Streptococcal Genetics (6th) : Asheville, North Carolina, U.S.A.

2002, 4. 14-17 “The peptide lactone-regulated gelatinase production in *Enterococcus faecalis*” Nakayama, J., Kariyama, R., Cao, Y., Kumon H., de Vos, W. M., Nagasawa, H., Sonomoto, K.

3. 第16回Bacterial Adherence & Biofilm学術集会 : 大分 2002, 7. 13

「岡山大学泌尿器科におけるMRSA尿路感染症の臨床的背景と付着因子に関する検討」

安東栄一, 門田晃一, 光畑律子, 狩山玲子, 二ノ宮裕子, 上原慎也, 津川昌也, 公文裕巳

4. 10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections :

Tsukuba, Japan 2002, 10. 16-19 “Genotypic and clinical characteristics of *Staphylococcus aureus* in urinary tract infection” Kariyama, R., Araki, M., Mitsuhata, R., Ando, E., Monden, K., Ninomiya, Y., Uehara, S., Tsugawa, M., Kumon, H.

A. 宛名：分担研究者 花田信弘 殿

B. 指定課題名：平成14年度医療技術評価総合研究事業

「高齢者の口腔保健と全身的な健康状態の関係についての総合研究」

C. 研究協力課題名：「要介護高齢者の口腔微生物叢に対する口腔ケアの効果」

D. 研究協力者：

泉福英信（国立感染症研究所細菌第一部・室長）

佐藤勉（日本歯科大学衛生学教室 助教授）

中村論（日本歯科大学衛生学教室 大学院生）

東京都豊島区歯科医師会

E. 研究の目的：

過去2年間の厚生科学研究において要介護高齢者の口腔微生物叢を検討した結果、*Candida albicans*が歯垢中で38%と高率に検出され、また*Enterobacter cloacae*も歯垢中で16%と高率に検出された。*Klebsiella pneumoniae* (9%)、*Pseudomonas* sp. (12%)も検出された。低率であるが*Staphylococcus aureus* (MRSA; MSSA)も歯垢で検出された。口腔にこれらの細菌が感染している要介護高齢者では、誤嚥性肺炎などの全身疾患へのリスクが高い事が考えられる。しかし、この現象は加齢という基本的背景に偶発的に合併している様々な全身疾患が複合した結果である可能性は否定できず、感染している口腔細菌と個々の疾患を直接結び付けて考えることは困難である。いずれにしてもこのような病原菌が高頻度に口腔に検出されるならば、それらの菌を除去していく口腔ケアの手法を開発する必要がある。そこで、4年前から豊島区歯科医師会により月2回歯科医師および歯科衛生士による歯科口腔ケアを受けている東京都豊島区の特別養護老人施設において、その口腔内の病原菌を検討することにより、口腔ケアが菌の除去に有効であるか検討することを目的とした。

F. 研究計画：

（対象・方法）2002年4月から2002年3月の間に東京都豊島区にある4つ特別養護老人施設（A, B, C, D）において、37, 34, 38, 19人で計128人の要介護高齢者を対象とし、対象者の左側上顎臼歯部5・6・7番の頬側歯茎部の歯垢をシードスワブ1号の滅菌キャップ付綿棒で5往復擦過し、さらに180度回転し、5往復擦過後キャリブレア・チューブに投入する方法で採取した。また舌上サンプルも、残存菌をもたない被験者により上述の方法と同様に、舌上を擦過し採取した。歯垢および舌上サンプルは（株）ビー・エム・エルへ郵送、培養し、微生物の同定を行った。微生物検査は以下の方法で行った。試料の入った溶液をスパイラルシステムを用いてコロンビア5%ヒツジ血液寒天培地 [Nippon Becton Dickinson Company (BD)]、BTB培地 (BD)、チョコレート寒天培地 (BD)、OPAブドウ球菌寒天培地 (BD)、PASA培地 (BD)、ブルセラ血液寒天培地 (栄研)、サブロー培地 (BD)へ植菌し、24~48時間の初代分離培養を行った後、コロニーを釣菌し、以下に示す確認培地および同定キットを用いて、起炎菌を中心に目的菌の同定を行った。① MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) および MSSA (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*) : PSラテックス (栄研)・ウサギプラズマ (栄研)・MRSAスクリーニング

培地(BD), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Moraxella(Branhamella) catarrhalis*および他のグラム陰性桿菌: VITEK [bioMerieux vitek Japan(BVJ)], β 溶連菌: セロアイデンストレプトキット(栄研)・rapid ID32 strep API(BVJ), *Streptococcus pneumoniae*: 肺炎球菌鑑別用ディスク/タキソPディスク(BD)・ストレプト(BVJ), *Haemophilus influenzae*: ヘモフィルスID4分画(BD), *Candida sp.*: カンジダチェック(ヤトロン)

G. 結果:

微生物検出結果を表1・2に示す。特に歯科医師および歯科衛生士による口腔ケアの入っていない要介護施設の結果を対照にして比較検討を行った。歯垢においては、施設Aの低いカンジダ陽性率が認められ、一方施設Cの高いカンジダ陽性率も認められた。舌上においては、施設A, Bの低いカンジダ陽性率が認められた。また、*E. corrodens*の高い歯垢中陽性率は、施設AとDにおいて認められた。*Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas maltophilia*, *Klebsiella oxytoca*の陽性率は、歯垢、舌上ともにすべての施設において低かった。*Klebsiella pneumoniae*の陽性率は、歯垢、舌上ともに施設AとCにおいて低かった。*Pseudomonas aeruginosa*の陽性率は、歯垢、舌上ともに施設Cにおいて高く、施設Dにおいて低かった。MRSAの陽性率は、歯垢、舌上ともに施設CとDにおいて低かった。

H. 考察:

全体を通して考察すると歯垢および舌上ともにカンジダと緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の陽性率が高かった施設Cが特徴的であり、他の施設では口腔ケアの口腔微生物への効果が認められることが示唆された。このような異なりが生じたのは、各施設における被験者の特徴の違いや口腔ケアの方法の違いなどいくつかの項目を考えることができる。今後、これらの項目を検討してまた検討する被験者の数も増やして行き、十分な検討からよりよい口腔ケアの方法を確立していく必要がある。

I. 発表論文

1. H. SENPUKU, A. TADA, M. TAKADA, T. SATOH, N. HANADA. Reproducibility of oral bacterial isolation in elderly. J. J. Infect. Dis. 55: 61-62. 2002.
2. Y. NOMURA, H. TAKEUCHI, H. SENPUKU, H. IDA, E. YOSHIKAWA, K. KOYAMA, N. KANAZAWA, N. HANADA. Survey of dental hygienists and health care workers for microorganisms in the oral cavity. J Infect Chemother. 8:163-167 2002.
3. Y. NOMURA, A. ETO, N. HANADA and H. SENPUKU. Identification of motif binding with HLA-DR 8 (DRB1*0802) for peptide vaccine against *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol. 17: 209-14. 2002.
4. K. MATIN, S. Md. ABDUS, J. AKHTER, N. HANADA and H. SENPUKU. Role of Stromal Cell derived factor-1 (SDF-1) in the development of autoimmune diseases in nonobese diabetic (NOD) mice. Immunology 107: 222-232. 2002
5. H. SENPUKU, A. SOGAME, E. INOSHITA, Y. TSUHA, H. MIYAZAKI and N. HANADA. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. Gerontology 2003 in press.
6. M. KAWASHIMA, N. HANADA, T. HAMADA, J. TAGAMI and H. SENPUKU. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. Oral Microbiol. Immunol. 2003 in press.

7. R. NAKAO, N. HANADA, T. ASANO, T. HARA, Md A. SALAM, K. MATIN, Y. SHIMAZU, T. NAKASONE, S. HORIBATA, T. AOBA, M. HONDA, T. AMAGASA, H. SENPUKU. Assessment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leukocyte. Immunology 2003 in press.
8. 野村義明、武内博朗、西川原総生、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 2；口腔バイオフィルム（歯垢）の性状と解明、デンタルダイヤモンド. 27: 46 - 49. 2002.
9. 武内博朗、野村義明、西川原総生、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 2；遺伝子工学的技術 1, PCRを利用した診断法、デンタルダイヤモンド. 27: 52 - 57. 2002.
10. 泉福英信、花田信弘：やってみよう微生物・生化学検査；歯科微生物・生化学検査、デンタルハイジーン、22: 498-503. 2002.
11. 泉福英信、由川英二：やってみよう微生物・生化学検査；微生物検査の実態、デンタルハイジーン、22: 504-510. 2002.
12. 野村義明、泉福英信：やってみよう微生物・生化学検査；検査の活かし方、デンタルハイジーン、22: 511-514. 2002.
13. 泉福英信、荒川正嘉：ハイドロキシアパタイトペーストは、う蝕撲滅の救世主になるか、デンタルダイヤモンド. 379: 62 - 66. 2002.
14. 武内博朗、野村義明、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用7；モノクローナル抗体を利用したう蝕予防法、デンタルダイヤモンド. 377: 52 - 57. 2002.
15. 津覇雄三、松本直子、武内博朗、花田信弘、泉福英信：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用8；エライザ、ウエスタンブロット法を用いた歯科疾患 のリスク診断法、デンタルダイヤモンド. 378: 46 - 49. 2002.
16. 松本直子、中尾龍馬、武内博朗、花田信弘、泉福英信：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用11；口腔疾患研究に利用できるモデル動物、デンタルダイヤモンド. 385: 50 - 54. 2002.
17. 泉福英信、花田信弘：改定版 病気がわかる本；なぜ、人は虫歯になるのか？ Newton別冊, pp.170 - 175. 2002.

表1 施設AとBにおける歯垢および舌上の各口腔微生物の検出率

細菌と真菌	要介護高齢者		施設A		施設B	
	歯垢 n=329	舌 n=75	歯垢 n=25	舌 n=37	歯垢 n=22	舌 n=34
<i>Candida sp.</i>	141 (43%)	33 (44%)	7 (28%)	13 (35%)	9 (41%)	10 (29%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	53 (16%)	10 (13%)	5 (33%)	4 (11%)	1 (5%)	1 (3%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	37 (11%)	13 (17%)	2 (8%)	2 (5%)	1 (5%)	1 (3%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31 (9%)	10 (13%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (9%)	4 (12%)
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	26 (8%)	3 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	21 (6%)	12 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	1 (3%)
<i>Staphylococcus aureus (MSSA)</i>	18 (5%)	4 (5%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (9%)	2 (6%)
<i>Coagulase negative staphylococci: CNS</i>	17 (5%)	3 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (6%)
<i>Serratia marcescens</i>	12 (4%)	7 (9%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 (3%)	5 (7%)	1 (5%)	2 (5%)	1 (5%)	2 (6%)
b-haemolytic streptococcus (type B)	9 (2%)	4 (2%)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8 (2%)	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (6%)
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	8 (2%)	3 (4%)	2 (8%)	1 (3%)	1 (5%)	2 (6%)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	7 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (6%)

表2 施設CとDにおける歯垢および舌上の各口腔微生物の検出率

細菌と真菌	要介護高齢者		施設C		施設D	
	歯垢 n=329	舌 n=75	歯垢 n=18	舌 n=38	歯垢 n=11	舌 n=18
<i>Candida sp.</i>	141 (43%)	33 (44%)	11 (61%)	22 (58%)	4 (36%)	7 (39%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	53 (16%)	10 (13%)	2 (11%)	3 (8%)	3 (27%)	3 (17%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	37 (11%)	13 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31 (9%)	10 (13%)	1 (6%)	2 (5%)	1 (9%)	2 (11%)
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	26 (8%)	3 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	21 (6%)	12 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	1 (6%)
<i>Staphylococcus aureus (MSSA)</i>	18 (5%)	4 (5%)	1 (6%)	3 (8%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Coagulase negative staphylococci: CNS</i>	17 (5%)	3 (4%)	0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Serratia marcescens</i>	12 (4%)	7 (9%)	1 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 (3%)	5 (7%)	2 (11%)	5 (13%)	0 (0%)	0 (0%)
b-haemolytic streptococcus (type B)	9 (2%)	4 (2%)	1 (6%)	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8 (2%)	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	8 (2%)	3 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	7 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

A. 宛名：分担研究者 花田信弘 殿

B. 指定課題名：平成14年度医療技術評価総合研究事業

「高齢者の口腔保健と全身的な健康状態の関係についての総合研究」

C. 研究協力課題名：「口腔内環境と嚥下性肺炎の病態変化機構の解明；高齢者における口腔内環境の研究」

D. 研究協力者：

泉福英信（国立感染症研究所口腔科学部・主任研究官）

久山佳代（日本大学松戸歯学部病理学・講師）

山本浩嗣（日本大学松戸歯学部病理学・教授）

E. 目的：

嚥下性肺炎は、無歯顎者に比べ有歯顎者で多いとの報告から、口腔内環境が本疾患の発症の一つの誘因になっていると考えられている。それ故口腔内環境に影響を与える因子である口腔微生物に起因する日和見感染症の予防対策が急務である。特にカンジダは嚥下性肺炎の原因菌である嫌気性菌と共凝集しやすいため、その病原性を発揮する環境についての研究が必要である。また口腔内環境および病態に深く関わっている唾液の評価も併せて行うことが重要と考えられる。本研究では高齢者の口腔剥離細胞診標本にみられたカンジダ属の形態計量学的検索、培養同定検査および唾液中EGF濃度の測定を行い、若干の興味ある知見を得たので報告する。

F：方法

① 口腔カンジダ属の臨床病理学および細胞学的検索

臨床症状を随伴し、さらに剥離細胞診にて口腔カンジダ症と診断された高齢者(65歳以上,平均71.5歳)70症例のカンジダ属について、臨床病理学および画像解析プログラム(Mac SCOPE ver.2.55)にて計量学的観察を施した。対照として腔カンジダ症20症例とした。

② 高齢者唾液中カンジダ属の同定検査およびEGF濃度の測定

インフォームドコンセントを行った要介護高齢者17名および健康成人20名に対し、舌擦過物を真菌分離用培地に塗抹し、37℃にて培養を行った。形成されたコロニーはカンジダチェックにて属の鑑別を行った。さらに安静時の唾液採取を行い、ELISA法にて上皮細胞増殖因子(EGF)の定量を行った。

G：結果・考察

① 口腔カンジダ属の臨床病理学および細胞学的検索結果

口腔カンジダ症と診断された高齢者70名の内訳は、部位が舌27名、歯肉15名、_粘膜13名、口蓋11名、口唇4名であり、主訴が白斑、剥離びらん、刺激痛、発赤および舌乳頭の萎縮の順であった。口腔粘膜で検出されたカンジダ属は、分芽細胞細胞、分芽胞子、仮性菌糸および菌糸のすべての形態がみられる二形性真菌であり、また口腔のカンジダ菌糸は、膿のそれと比較して長さ1.1倍、幅2.3倍と大きく、隔壁が不明瞭であった（表1）。その形態変換および成長を誘導する因子として口腔内温度、pH、炭素源および窒素源が関係するものと考えられた。

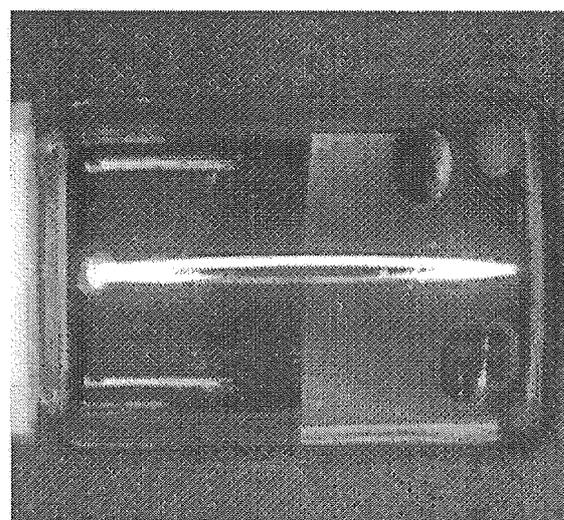
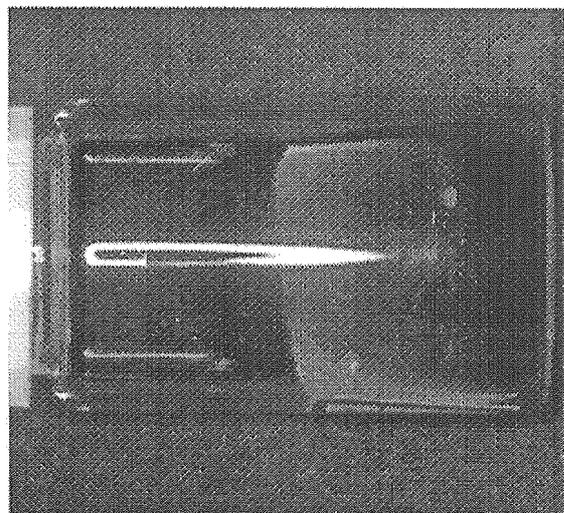
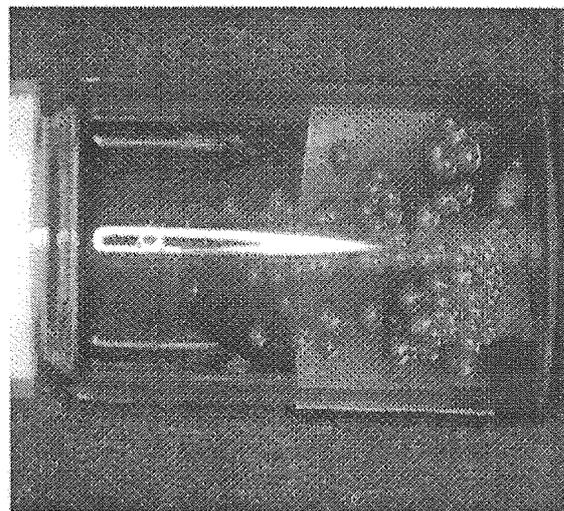
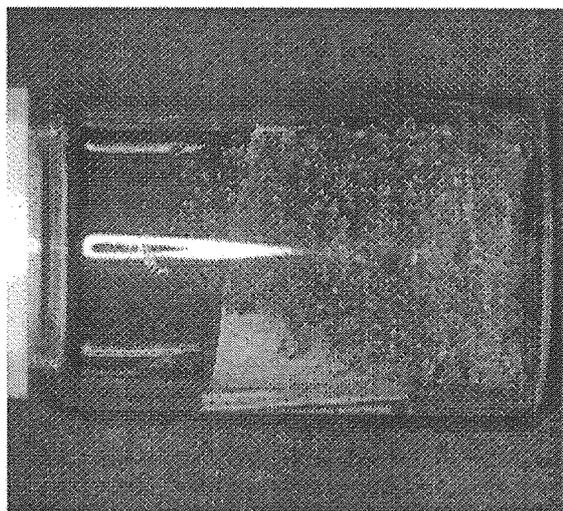
② 高齢者唾液中カンジダ属の同定検査およびEGF濃度の測定

要介護高齢者の舌擦過物培養同定検査の結果、健康成人の5%(*Candida albicans*)、要介護高齢者の78%(*Candida albicans*86%, *Candida tropicalis*14%)にコロニー形成が観察された。*Candida tropicalis*は、抗真菌剤に耐性を有するため特に高齢者の口腔内で増殖している菌種であることが報告されており、本調査でもそれを示唆する結果が得られた。唾液腺は種々の増殖因子を合成・分泌することによって口腔環境の維持に関与している。要介護高齢者平均EGF濃度(4.29±3.38ng/ml)は健康成人のそれ(1.70±1.02ng/ml)と比較して有意に低く、本結果から高齢者における唾液中の細胞分化増殖促進能力の低下が推察された。

表1. 口腔および膣スメア上で観察されたカンジダ属の計測結果 (μm)

	長さ		幅	
	口腔カンジダ属	膣カンジダ属	口腔カンジダ属	膣カンジダ属
菌糸	198.0 \pm 50.0	179.3 \pm 62.1	16.6 \pm 15.0	7.1 \pm 2.4
分芽細胞	10.9 \pm 5.8	13.1 \pm 5.3	6.9 \pm 3.8	6.2 \pm 1.6
分芽胞子	34.5 \pm 16.1	29.8 \pm 17.0	11.5 \pm 9.0	5.4 \pm 1.1
仮性菌糸	70.4 \pm 28.4	84.4 \pm 33.3	14.9 \pm 6.9	6.9 \pm 2.8

Candida属：緑茶～青緑色の集落を形成する。



A. 宛名：分担研究者 花田信弘 殿

B. 指定課題名：平成 14 年度医療技術評価総合研究事業

「高齢者の口腔保健と全身的な健康状態の関係についての総合研究」

C. 研究協力課題名 「要介護壮年者における口腔細菌の経時的変化の研究」

D. 研究協力者：

植松 宏（東京医科歯科大学大学院教授）

薄井由枝（東京医科歯科大学大学院）

今井 奨（国立保健医療科学院室長）

E. 研究の背景：身体的に機能障害を有する者にとって口腔内を清潔に保つことは容易なことではない。一方、現在口腔ケアと誤嚥性肺炎の関連について臨床の場からさまざまな研究が行われ、口腔ケアの有効性や重要性がさらに強調されている。しかしながら、具体的に口腔ケアによって細菌数がどれくらい減少すれば口腔ケアが成功しているかなど細菌学的基準となるべき指標ははまだ示されていない。

また、要介護者入居施設や救命センターなどで、歯科衛生士や看護師を中心として口腔ケアのアプローチが積極的に進められているが、口腔清掃介入のインターバルや頻度に対しても現在は明らかな指標がなく、手探りの状態で口腔ケアが行われている現状である。つまり、口腔ケアにおいて、基礎的研究、特に細菌学の視点からの研究は、始まったばかりである。

F. 研究の目的：

今回の研究の目的は、要介護者の口腔総細菌数の経時的変化を測定することにより、一日の細菌の変動を明らかにすることである。過去の研究を振り返ってみても、このような報告は少ない。しかしながら、これを明らかにすることにより、介護者がいつ口腔清掃介入を行えばより効果的に口腔環境の改善が期待できるのか、また誤嚥性肺炎のリスクが高くなる時間帯をある程度特定できれば、そのリスク回避につながる可能性も示唆できる。またさらに介護者の口腔ケアに要する肉体的負担も軽減することにつながる。

G 対象者：東京都近郊にある 2 つの要介護者入居施設で、以下の条件を満たした者 7 名が本研究の趣旨を理解・同意し、対象者として選ばれた。年齢は 47 歳から 83 歳、（平均年齢 64.5）女性 2 名、男性 5 名であった。対象者は全例ボランティアとした。

事前に全例に対し、研究目的、方法、安全性、危険性、利益、不利益、研究参加の自由、随時中止の自由、プライバシーの保持の各項目について十分な説明を行い、実際の実験方法を試みてもらい、文書により同意を得た。

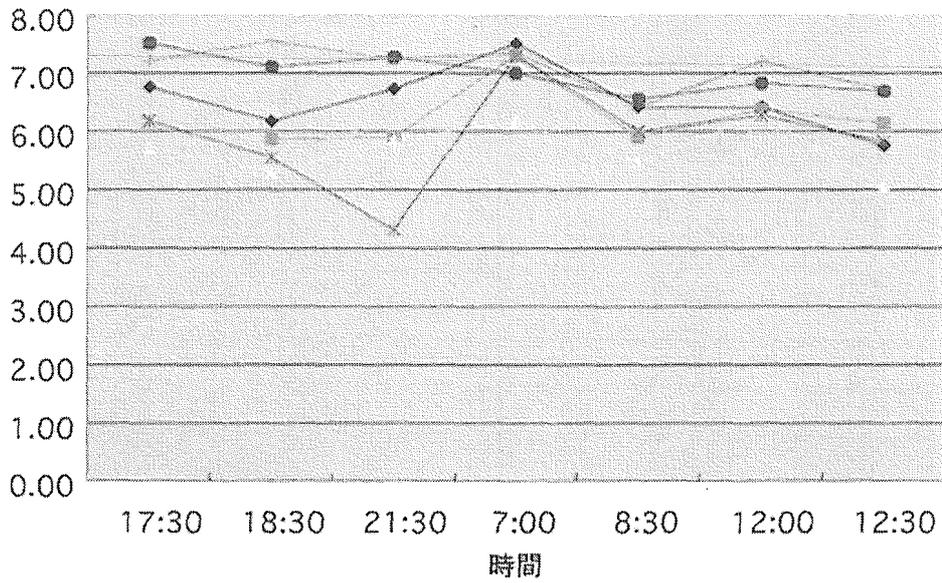
対象者の条件

1. 研究の内容を理解し、同意した者
2. 10mlの滅菌生食水で30秒間うがいし、吐き出しができる者
3. 上記の方法を1日7回実行可能な者
4. 検体採取前3週間、抗生物質を服用していない者

H. 方法：1日7回、起床時・食事前・就寝時に、検体を採取した。唾液中の細菌を採取するために10mlの滅菌生理的食塩水で30秒間うがいし、それを試験管に採取した。その後、採取サンプルを国立保健医療科学院口腔保健部、または検査会社に速やかに運び、10種類の培地に平板塗布法にて、培地上に塗り広げ、恒温器の中で培養した。一定の時間が経過した後、培養菌の集落形成単位（colony-forming unit）を測定し、統計処理を行い、各細菌数の経時的変化を調べた。また日和見菌（MRSA・真菌類・セラチア菌・緑膿菌）を検査会社においてPCR検査法により同定した。

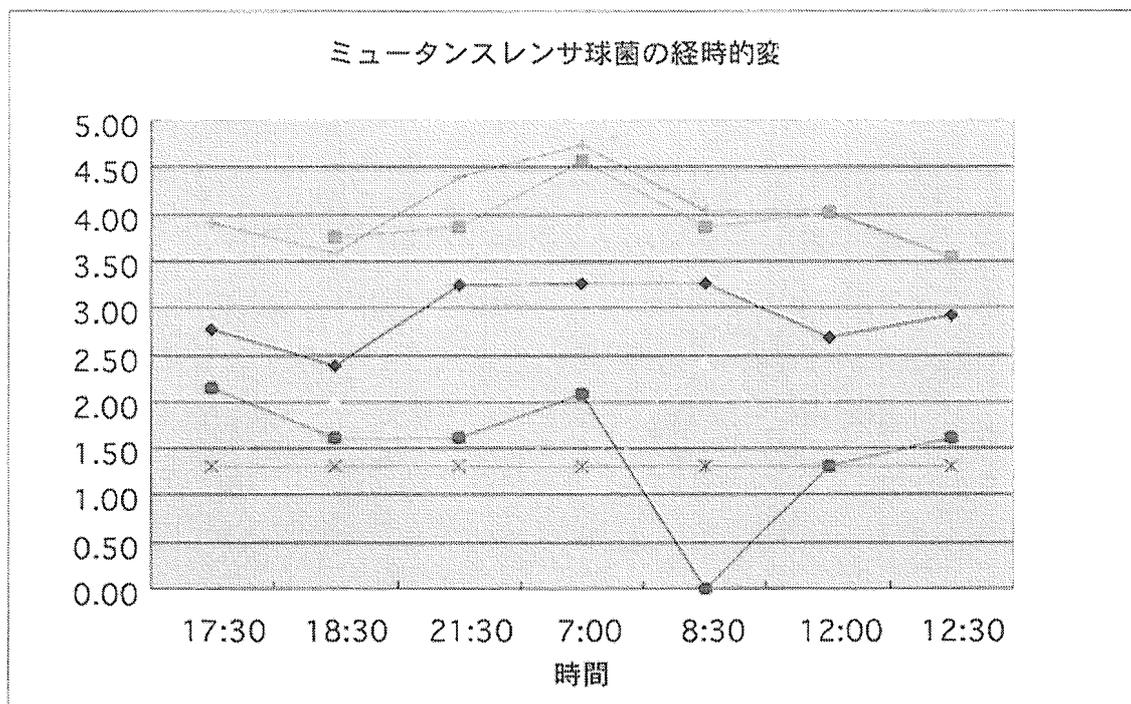
I. 結果：測定の結果、総細菌数は 10^5 から 10^7 の範囲で変動していることが明らかになった。また起床時が 10^7 前後ともっとも高く、食事30分以内に若干細菌数は減少することがわかった。また、義歯装着者において、カンジダ菌が起床時に増加するのが観察された。一方、有歯者において、起床時にミュータンスレンサ球菌の若干の増加を認めた。MRSA・緑膿菌・セラチア菌などの日和見菌は今回検出されなかった。

総細菌数の経時的変化



被検者	17:30	18:30	21:30	7:00	8:30	12:00	12:30
A	6.76	6.19	6.72	7.53	6.42	6.40	5.77
B		5.88	5.90	7.33	5.91	6.39	6.13
C	5.74	5.31	5.85	6.18	5.48	6.26	5.09
D	6.50	5.61	6.17	6.35	5.39	6.06	5.51
E	6.16	5.56	4.30	7.31	6.00	6.29	5.81
F	7.51	7.12	7.28	7.01	6.54	6.82	6.70
G	7.19	7.55	7.25	7.36	6.40	7.19	6.73

(注：17:30・12:00－食前時， 18:30・8:30・12:30－食後時
7:00－起床時， 21:30－就寝時)



	17:30	18:30	21:30	7:00	8:30	12:00	12:30
A	2.77	2.39	3.23	3.25	3.27	2.69	2.92
B		3.76	3.87	4.57	3.86	4.00	3.53
C	1.30	2.01	1.30	1.30	2.42	1.30	1.30
D	1.30	1.30	1.30	1.61	1.31	2.01	1.31
E	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30
F	2.15	1.61	1.61	2.09	0.00	1.31	1.61
G	3.90	3.58	4.40	4.74	4.04	4.04	3.54

カンジダ菌の経時的変化

	17:30	18:30	21:30	7:00	8:30	12:00	12:30
A	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
B		(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
E	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
F:総義歯	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)
G	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

J. まとめと考察：今回の調査の結果、各個人において若干の相違はあるが、日常生活中で総細

菌数はさほど変化していないこと、また個人で行う口腔ケアも口腔総細菌数にはあまり影響していないことが明らかになった。

口腔細菌種は多種で、複雑にかかわりあっているため、多種類の培地が必要になる。これからの課題として、指標菌を特定することができれば、もっと簡単に口腔ケアの細菌学的評価ができるようになるだろう。また、今回は要介護壮年・高齢者における調査であったが、健常成人の口腔細菌の経時的変化も計測する必要があるかもしれない。さらにこれからの同様な研究を進めるにあたり、焦点を絞ることで、口腔ケア介入時を示唆することができるかもしれない。