

図4 HIV感染患者と思われる人の診療をしたことがありますか

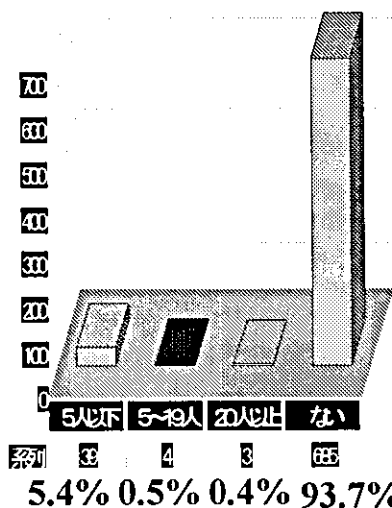


図5 「(1)ある」と答えた方にお聞きします。  
事前にHIV感染患者と認識していましたか

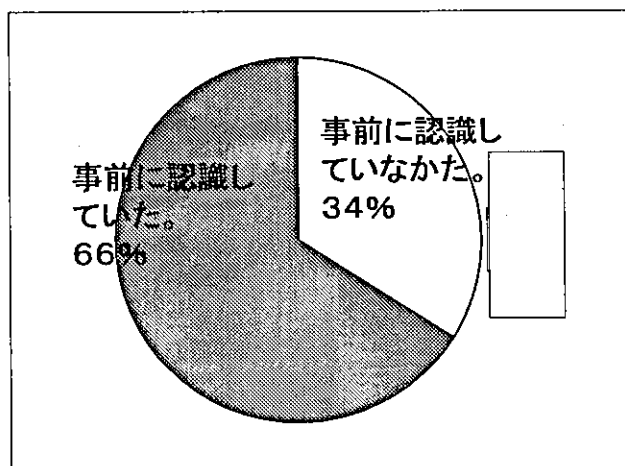


図6 「①事前に認識していた」場合、受け入れた経緯を下記からお選び下さい

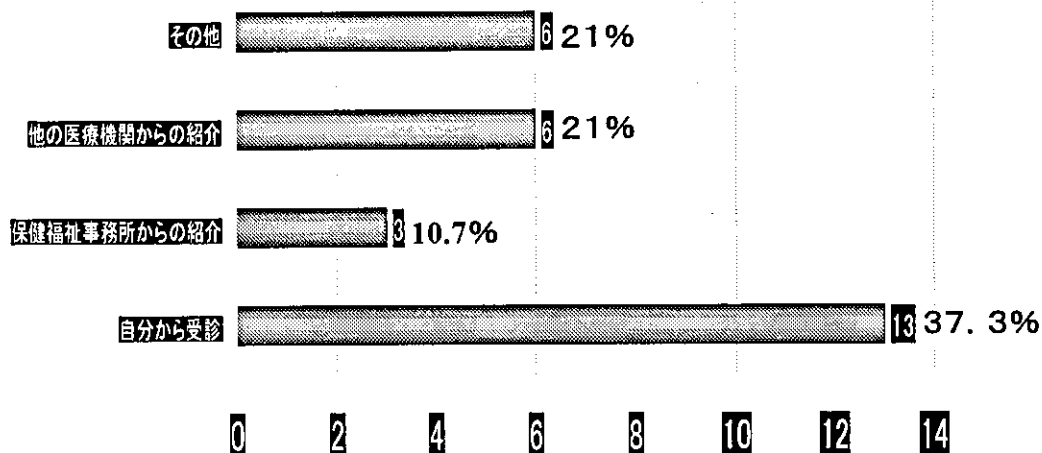


図7 B型肝炎、C型肝炎患者の歯科診療はどうお考えですか

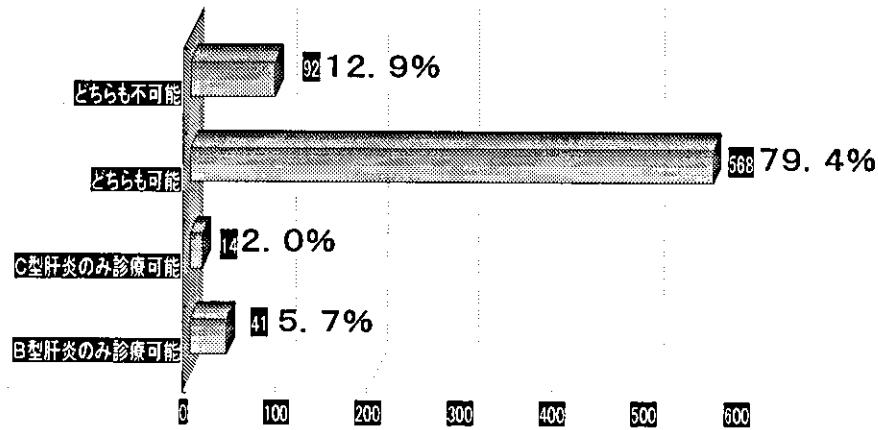


図8 今後、保健福祉事務所やエイズ拠点病院、神奈川県歯科医師会などに相談のあった陽性者への治療の紹介先になることについてどうお考えですか。

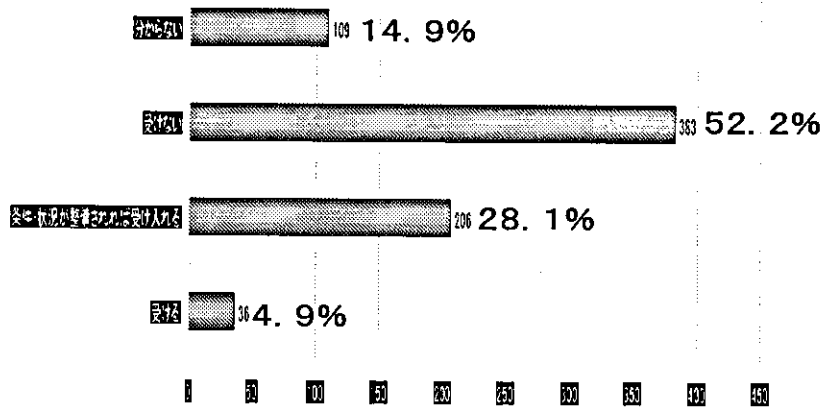


図9 「(2)条件(状況)が整備されれば受け入れる」と答えた方にお聞きします。どのような条件整備が必要ですか

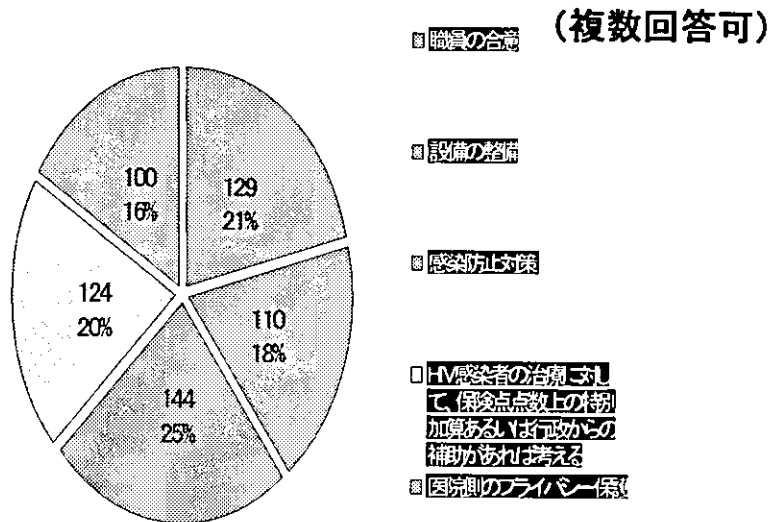


図10 「(3)受けない」と答えた方にお聞きします。その理由として  
 どんなものがありますか（複数回答可）

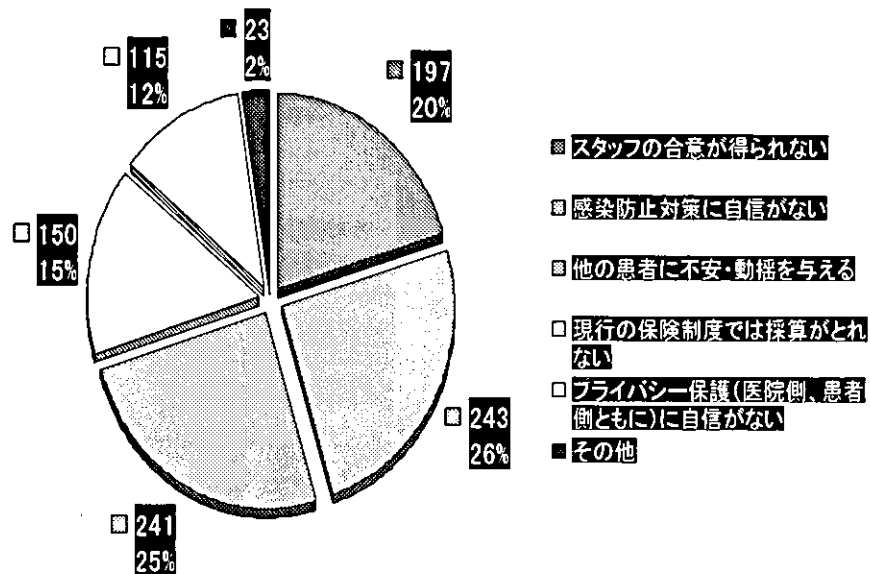


図11 医院のプライバシー厳守の条件で、HIV歯科診療協力診療所  
 として登録可能ですか。 非回答

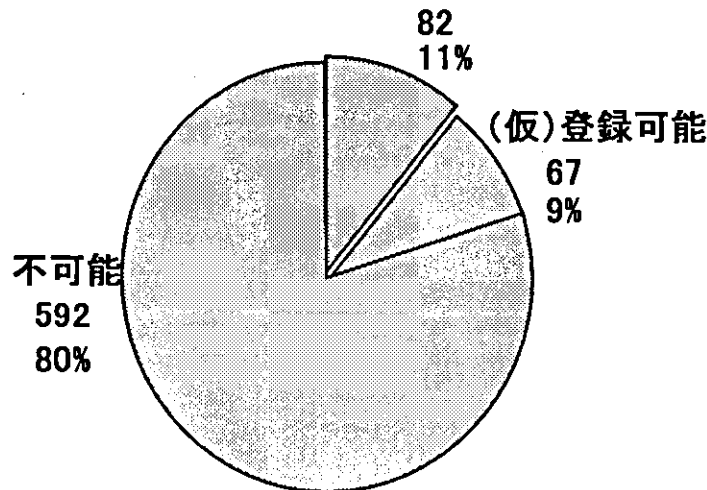


図12 患者の有する感染症を知るためにどのようにしていますか。

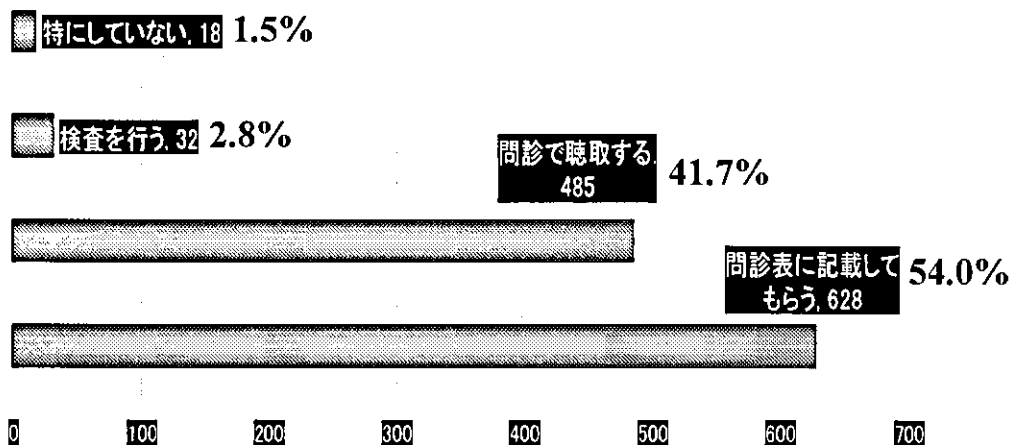


図13 防護用メガネ(フェースシールド含む)、マスク、グローブの全てを着用して診療していますか

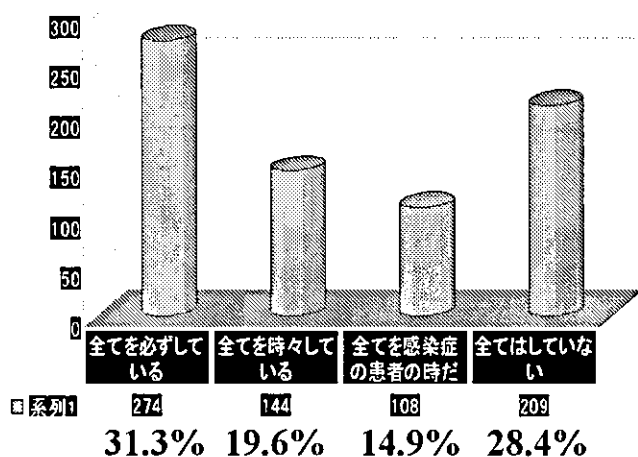


図14 オートクレーブを使用していますか

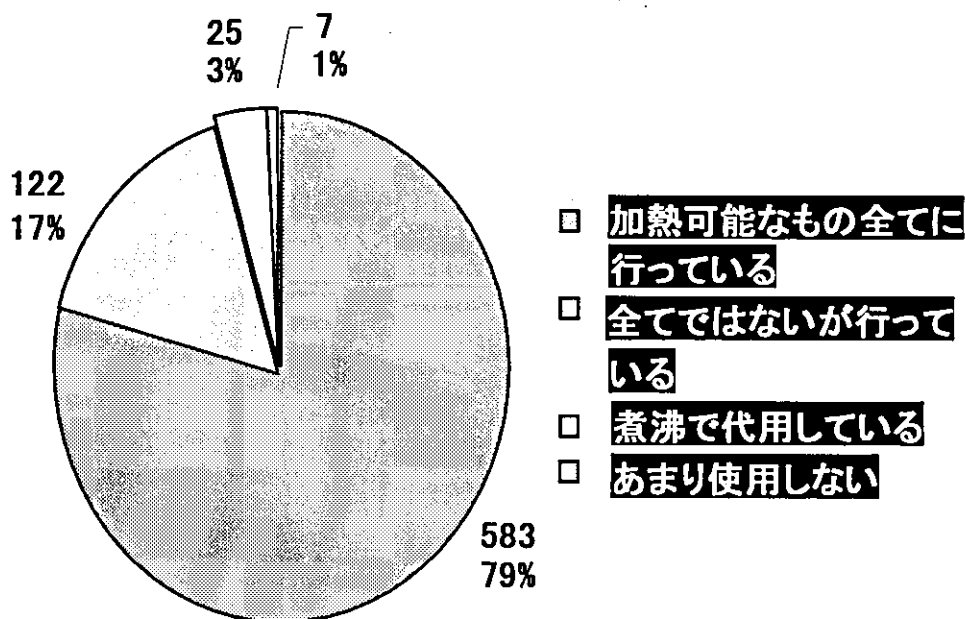


図15 消毒薬は主に何をしていますか

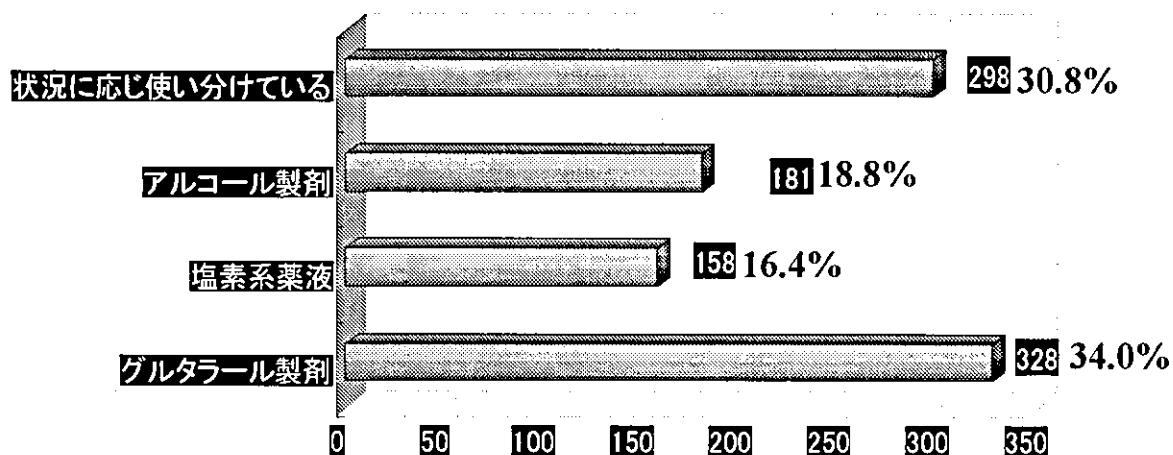


図16 患者ごとにハンドピースを交換していますか

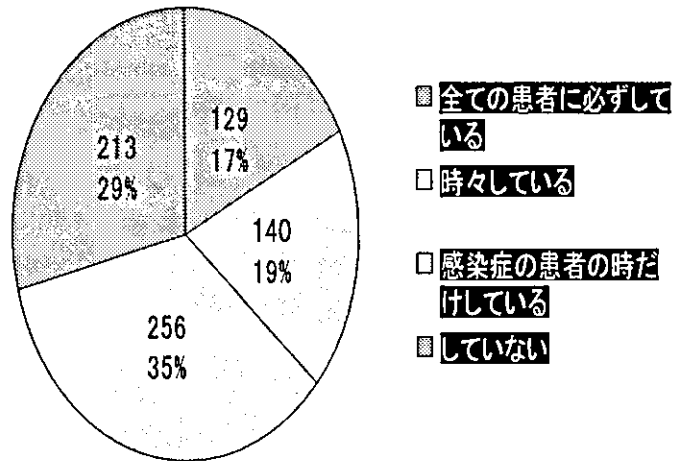


図17 患者10人当たり、ハンドピースの使用頻度は何人ぐらいですか

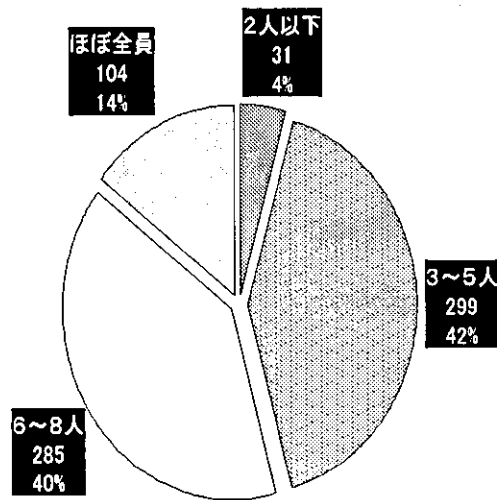


図18 他患者に使用した麻醉カートリッジを完全廃棄していますか

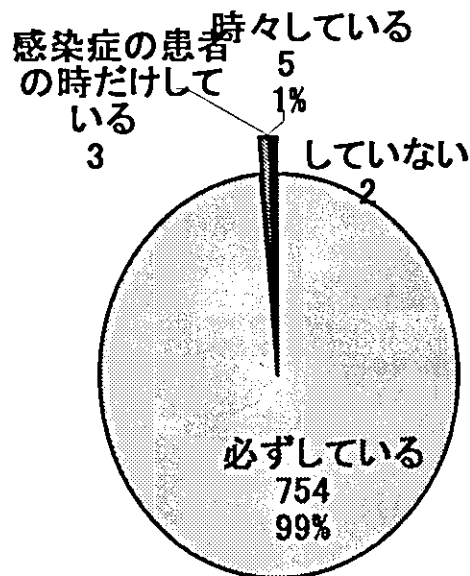


図19 器具、綿球、などの取り出し用に、別に滅菌したピンセットを用意していますか

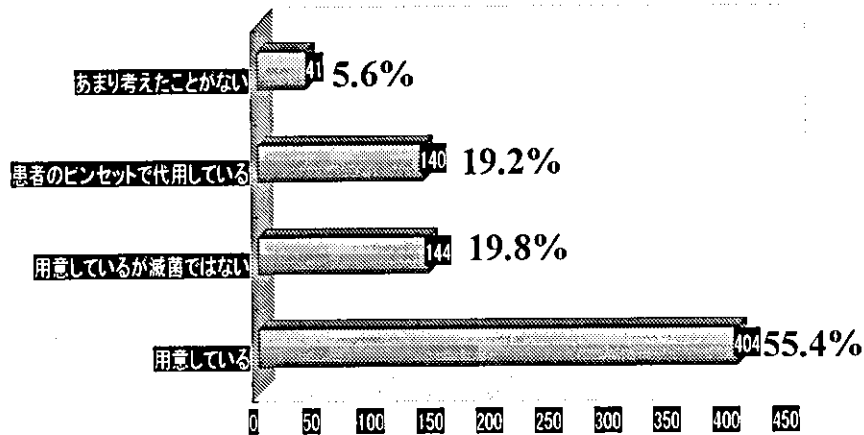


図20 感染対策に関しスタッフ教育をしていますか

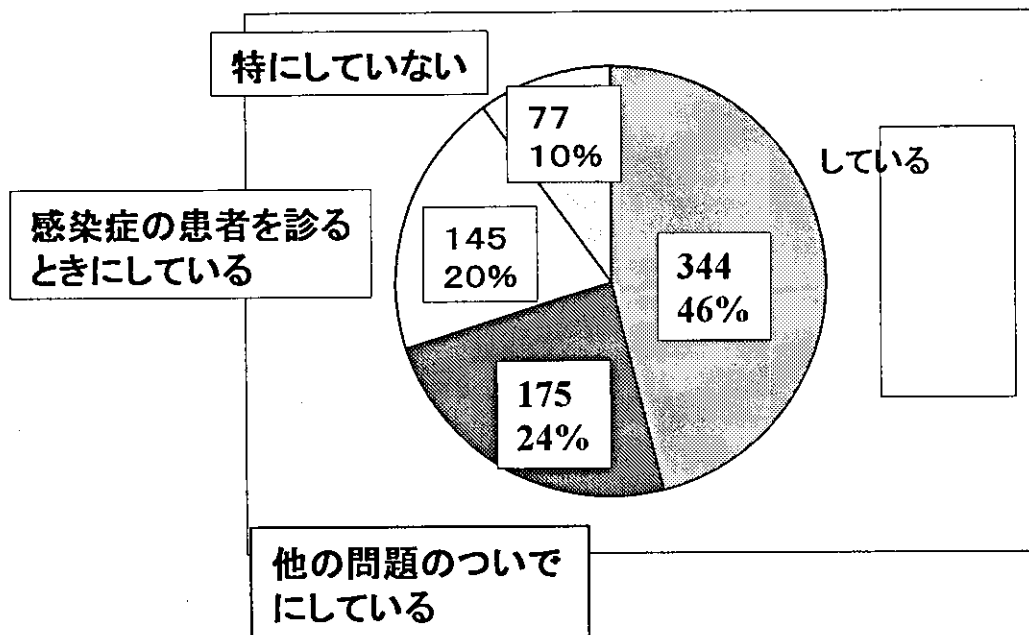


図21 感染対策マニュアルを作成していますか

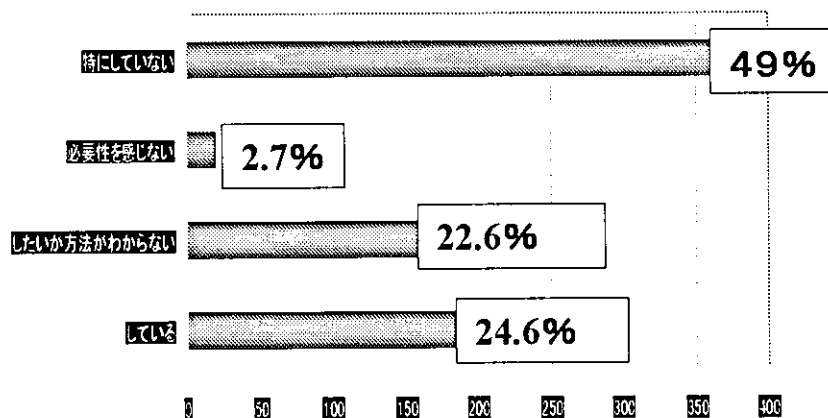


図22 歯科医療従事者の感染予防対策の研修状況についてお聞きします

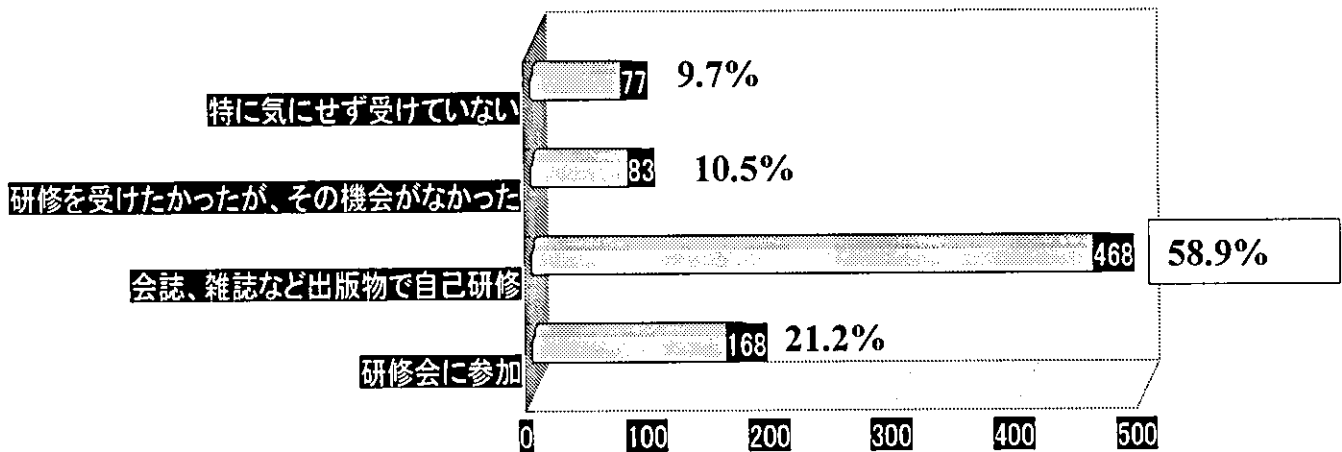


図23 「ユニバーサルプリコーション」とは何か知っていますか

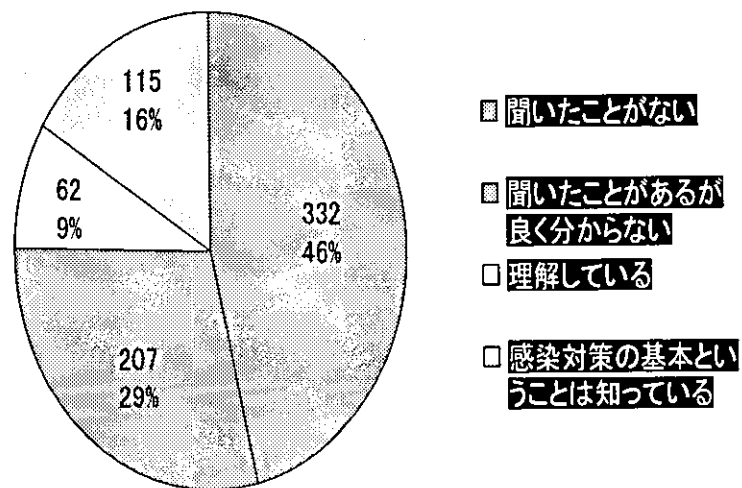


図24 唾液を介してヒトからヒトへHIVが感染すると思いますか

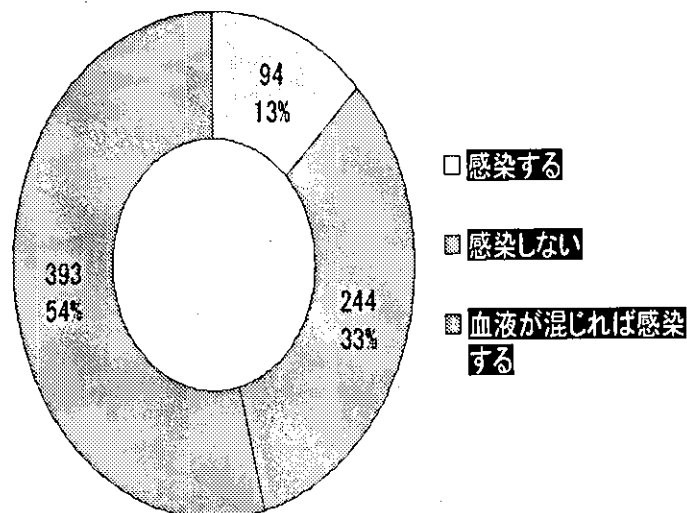


図25 唾液を介してヒトからヒトへSARSが感染すると思いますか？

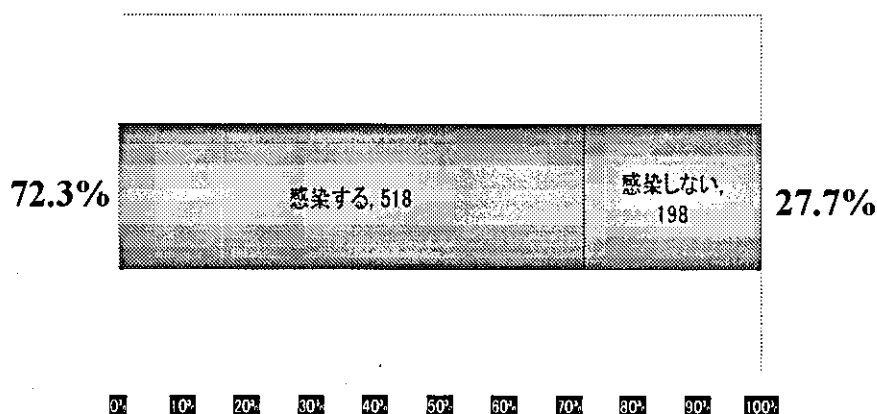


図26 歯科治療中に口外へ飛び散った飛沫(唾液、血液、水など)は、どれくらい飛ぶと考えますか？

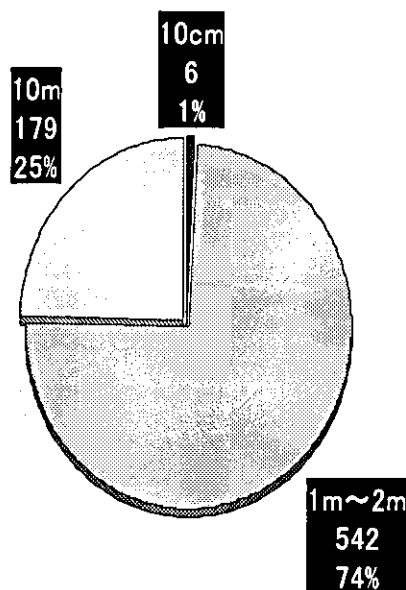


図27 歯科治療後の手指消毒の際に、消毒液を使用しますか

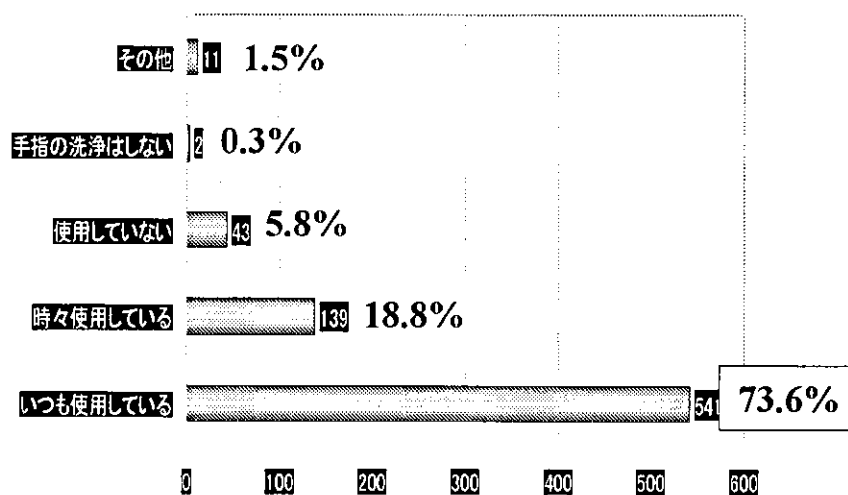




図28 インフルエンザワクチン接種を行いますか

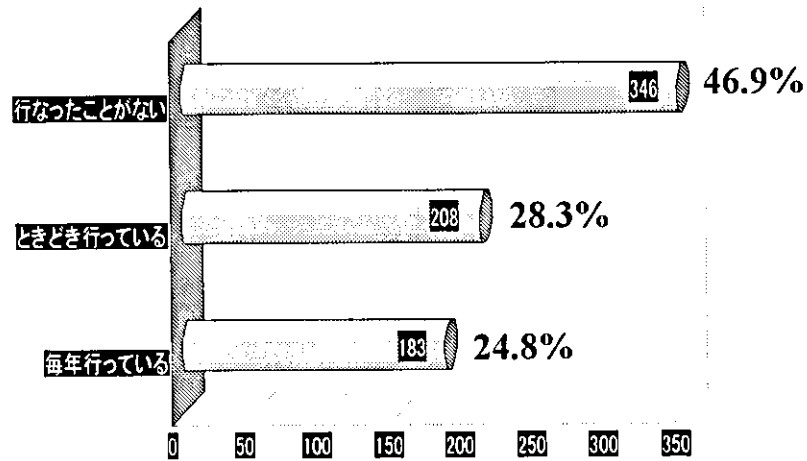


図29 B型肝炎ワクチン接種を行ったことがありますか

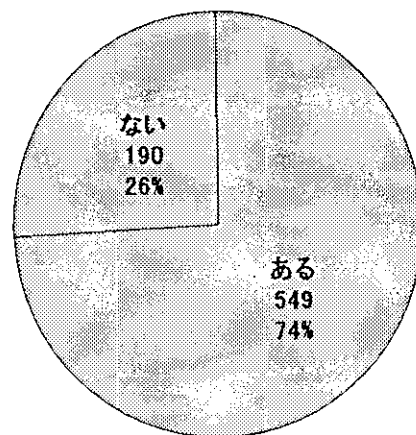


図30 SARSのような呼吸器感染症を持つ患者が来院したときのためにN95マスクを用意しています

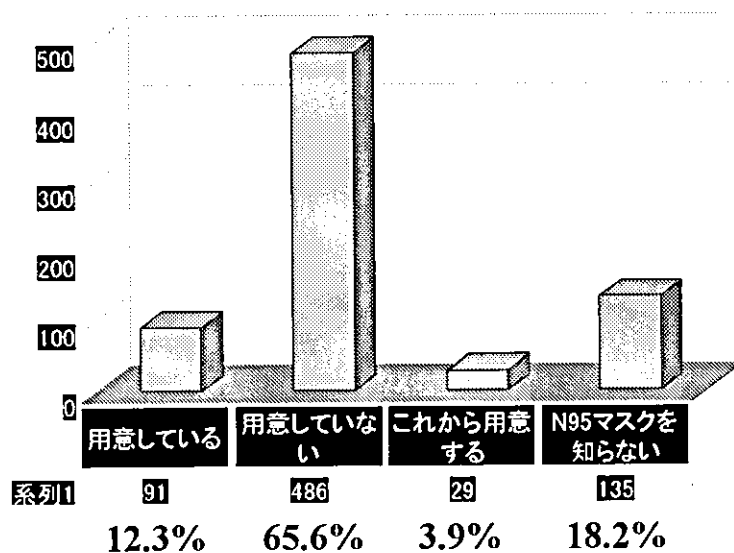


図31 HIV感染者に対するHAART療法を知っていますか

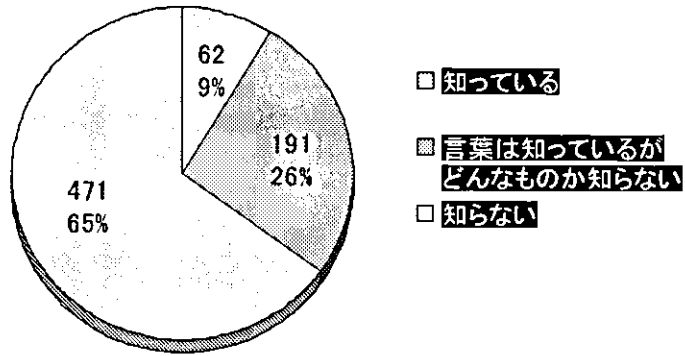


図32 デンタルユニットのスリーウェイシリンジから出てくる水が水道水よりも細菌が多く含まれていることを知っていますか

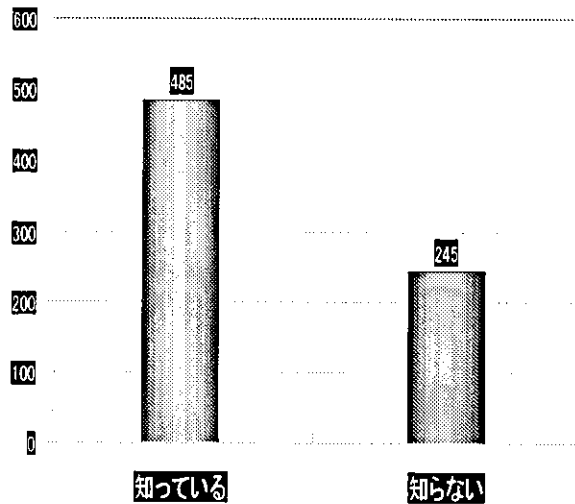
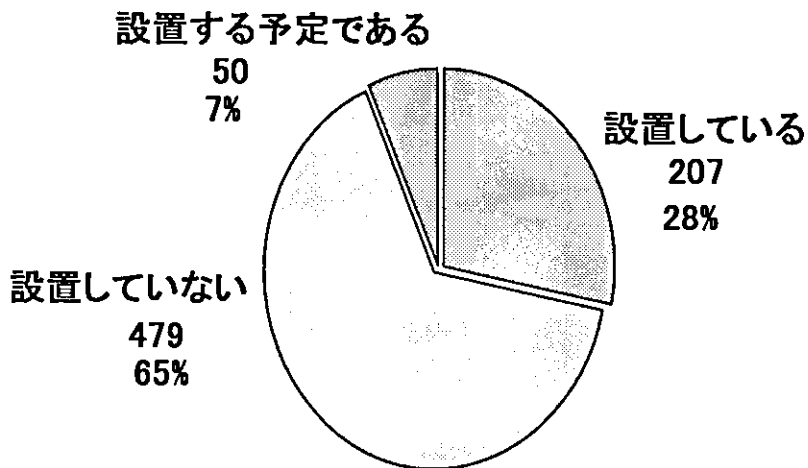


図33 自分の歯科医院内に口外バキュームを設置していますか



2) 埼玉県川越市歯科医師会に所属する歯科医師を対象としたアンケート調査の解析

図34 ユニバーサルプリコーションとは何か知っていますか？

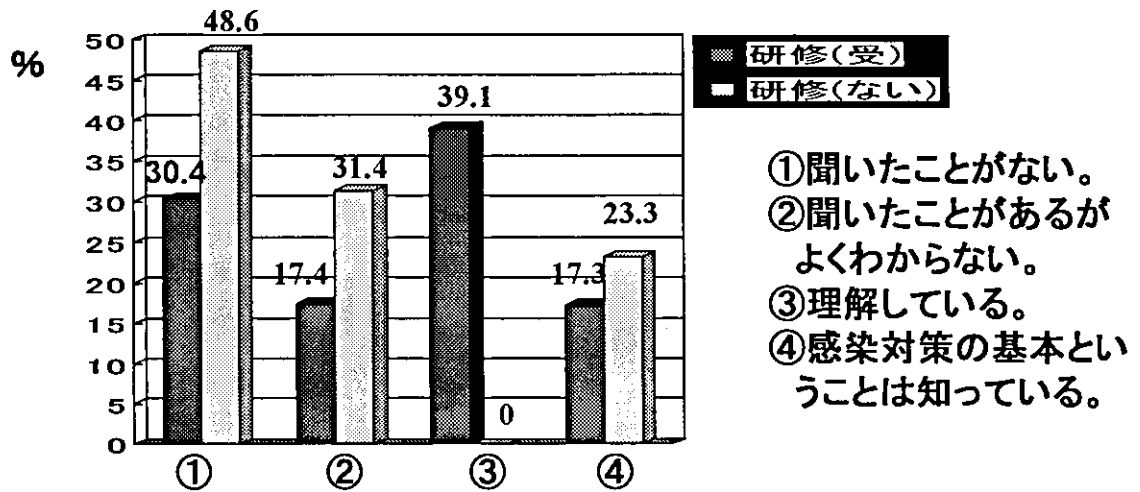


図35 唾液を介してヒトからヒトへHIVが感染すると思いますか？

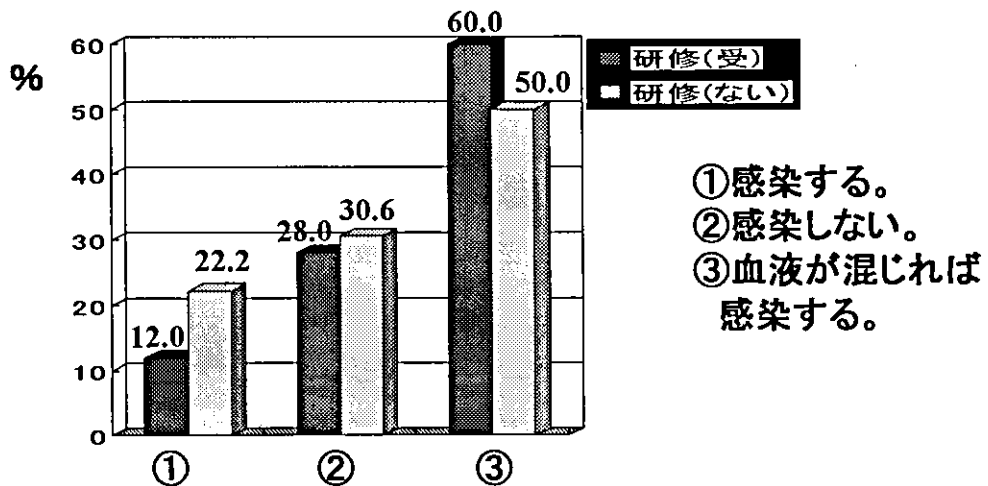


図36 唾液を介してヒトからヒトへSARSが感染すると思いますか？

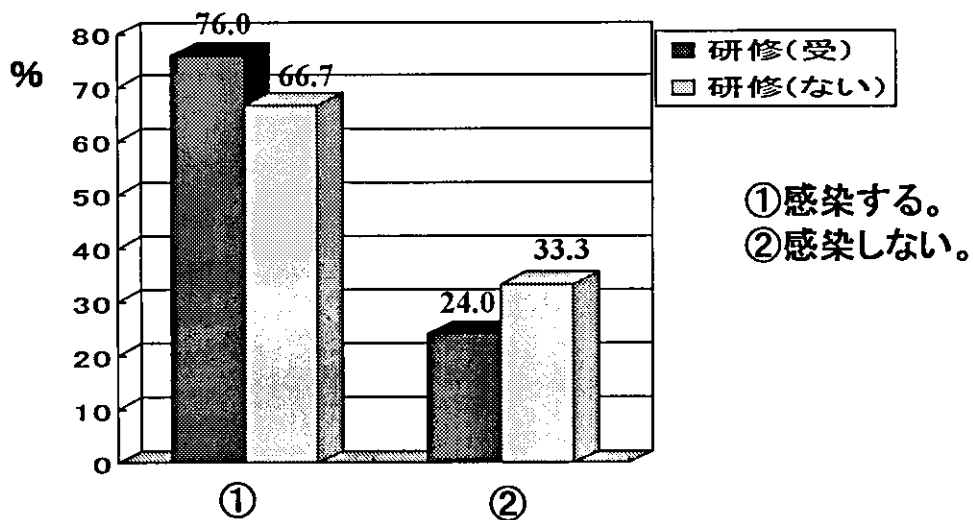


図37 歯科治療中に口外へ飛び散った飛沫(唾液、血液、水など)は、どれくらい飛ぶと考えますか？

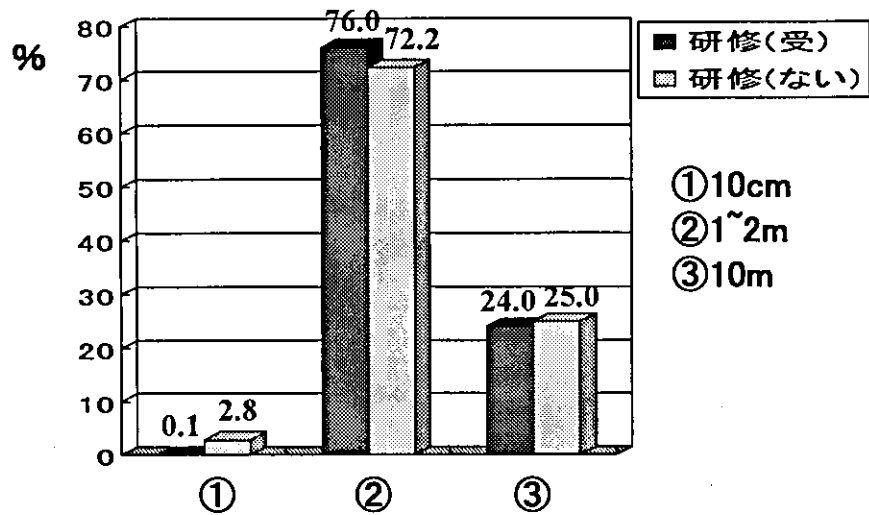


図38 歯科治療後の手指消毒の際に、消毒液を使用しますか？

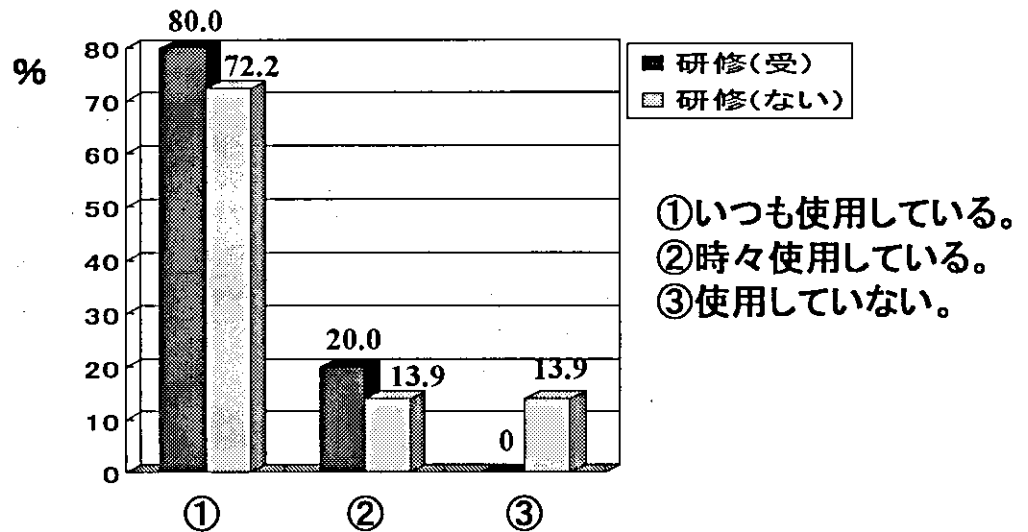


図39 インフルエンザワクチン接種を行いますか？

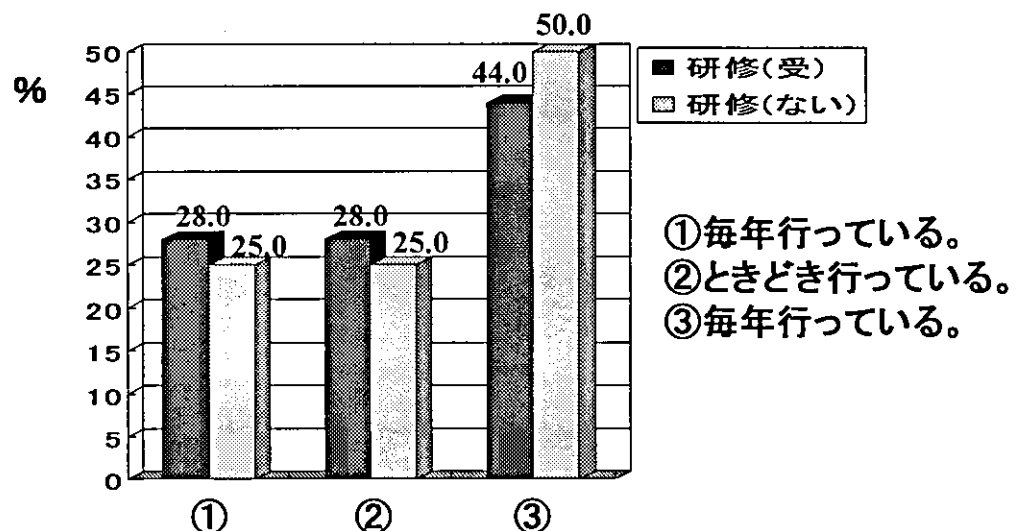


図40 B型肝炎ワクチン接種を行ったことがありますか？

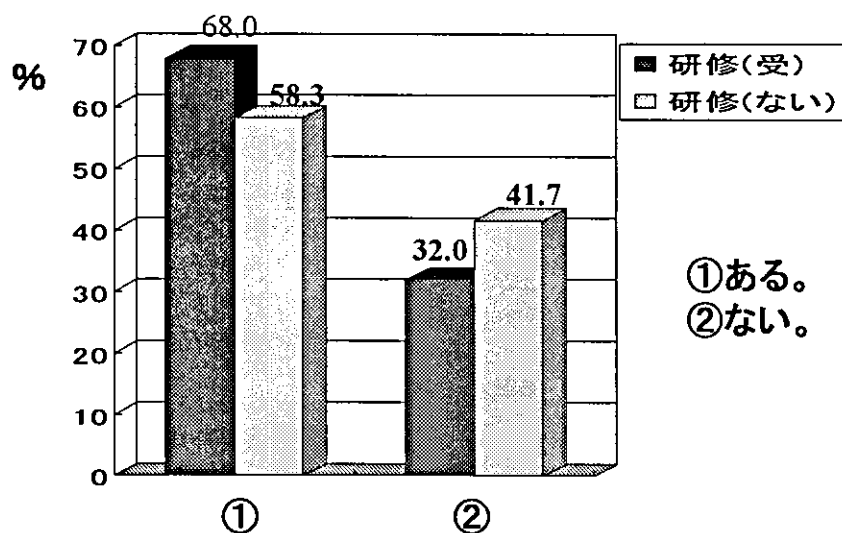


図41 SARSのような呼吸器感染症を持つ患者が来院したときのためにN95マスクを用意していますか？

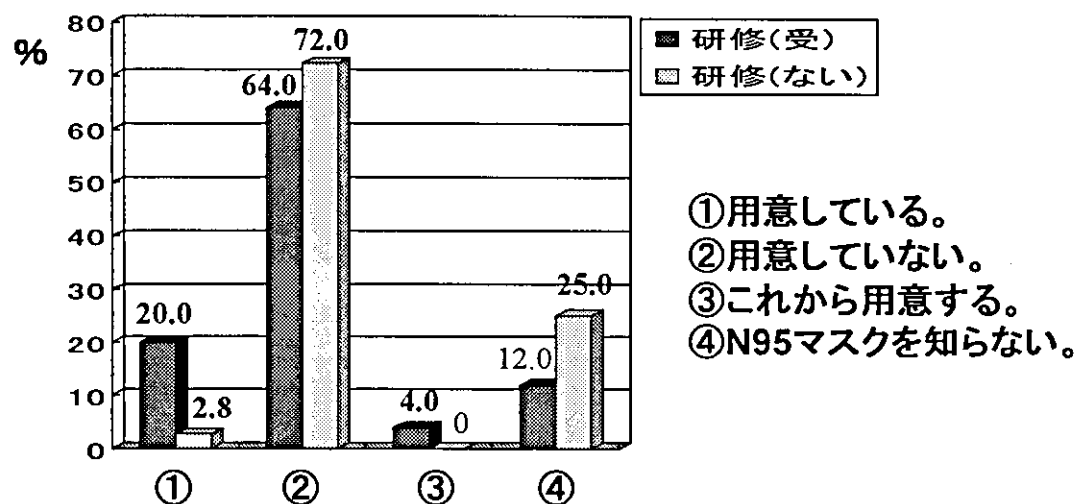


図42 HIV感染者へ対するHAART療法を知っていますか？

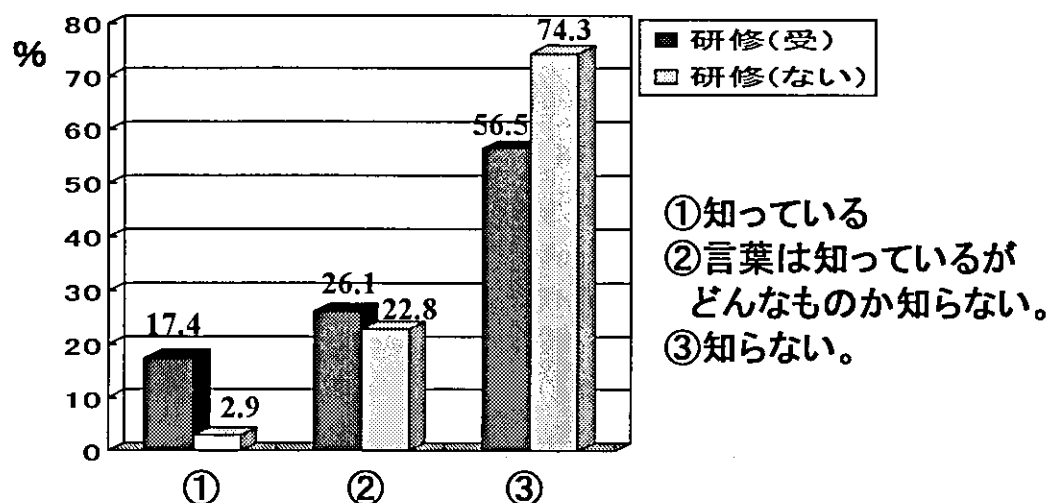


図43 デンタルユニットのスリーウェイシリンジから出てくる水が水道水よりも細菌が多く含まれていることを知っていますか？

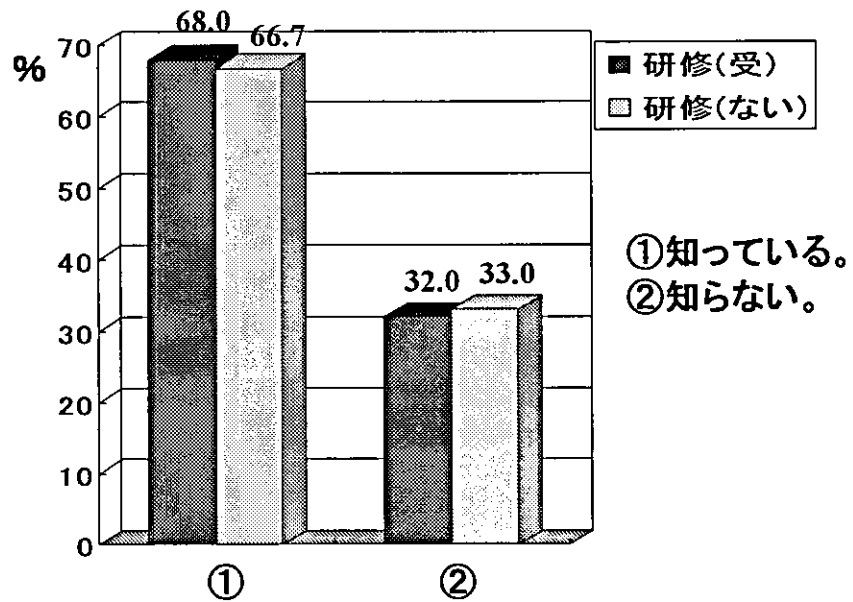
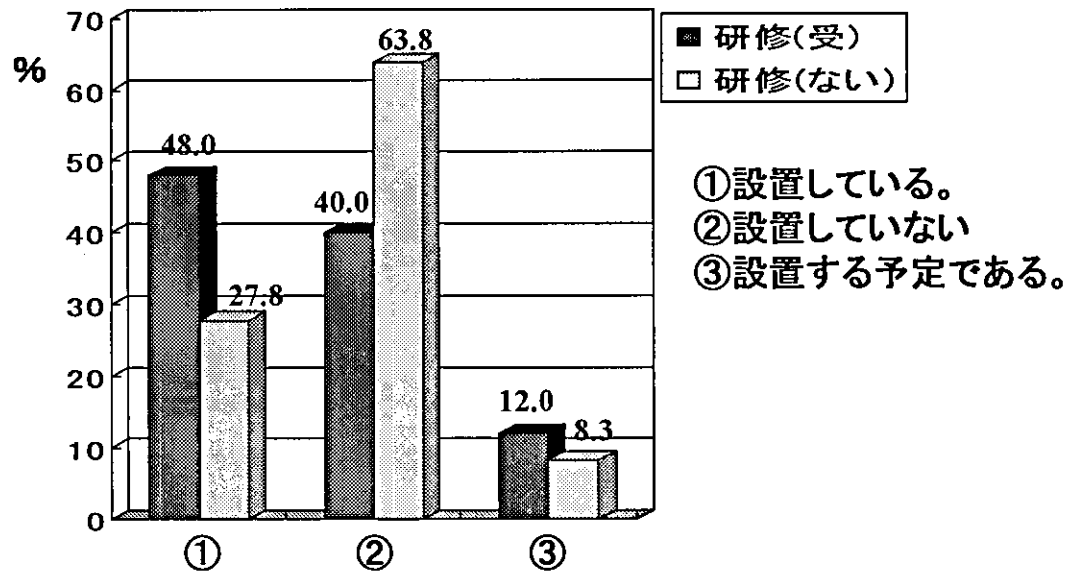


図44 自分の歯科医院内に口外バキュームを設置していますか？



分担研究報告書

「歯科医療における院内感染防止システムの開発」

「デンタルユニット内循環水における微生物の同定および評価システムの開発」

主任研究者：泉福英信（国立感染症研究所・細菌第一部・室長）

協力研究者：米沢英雄（国立感染症研究所・細菌第一部・協力研究員）

研究要旨：デンタルユニットの歯科用ハンドピース、超音波スケーラー、エアースリンジからの水サンプルを採取して、緑膿菌、レジオネラ、非結核性非定型抗酸菌を測定する微生物同定方法を確立することができた。この方法を用いれば用意にまた正確に、汚染状況を把握することができる。これらの方法から得られた結果を用いれば、院内感染対策の指標になる情報を得ることができる。

目的：

医療を行うにあたって、その安全性の確保は最も重要な課題であるが、院内感染のリスクは未だ減少しておらず、その監視体制の整備が望まれている。院内の環境や歯科用材料・器具・医療機器に形成される細菌バイオフィームは消毒薬に抵抗性を示し、そのことが院内感染の要因になる可能性が高い。院内におけるバイオフィーム形成菌は、外因的ないし内因的要因により供給される。

外因的要因として、緑膿菌、レジオネラ、非結核性非定型抗酸菌などのヒトに対して病原性のある菌が歯科用ユニットの配管内にバイオフィームをつくり、そこを通過した配水により歯科医療従事者が慢性的にレ

ジオネラに暴露され死亡した例が報告されている。

そこで、レジオネラなどの歯科用ユニット内汚染関わる微生物の簡易な微生物同定方法を確立し、歯科治療における院内感染の防止システムを確立することを目的として研究を行った。

調査方法

菌の分離同定

1. 検体

・歯科用ハンドピース、超音波スケーラー、エアースリンジからの検水は滅菌したポリエチレンビンに500 mLそれぞれ2本ずつ採取する。採水に際して種類、採水部位、日時、型式、水温、pH値、残留塩素濃度などの記録を必ずつける。

・コントロールとして水道水を同様に 2 本採取する。

・2本のうち1本はアメーバ分離用。もう1本には塩素中和用の 25%チオ硫酸ナトリウムを 1/500 を加えておき(チオ硫酸ナトリウムを添加した状態でオートクレーブして瓶を準備しておいてよい)、微生物学的検査をする。検体は採取後速やかに、クーラーボックスに入れ搬入し、検査は出来るだけ早く(2 時間以内に、遅くとも 48 時間以内に)始める。残余の検水は 4°C で保存しておく。採取された検体の菌数を予測出来ないため、濃縮検体と非濃縮検体を並行して検査する。

(1) 冷却遠心濃縮法：検体の汚濁が激しい場合にはこの方法が優れている。

滅菌した蓋付きの遠心管に検水 200 mL を入れ、バランスを取った後 6,000 g、10 分間(たとえば 20°C で)遠心する。静かに上清を除き、2 mL (100 倍濃縮)の滅菌蒸留水を加えて管内壁をよく洗い、沈渣を懸濁する(この遠心法は、ISO11731 で規定され、WHO のレジオネラ分離法にも採用されている。ちなみに 300-500 ml の容器を使用して遠心するとされている)。

・濃縮検体(下記の 2 mL)は、3 等分して、未処理、熱処理、アルカリ処理し、それぞれ一般細菌及びレジオネラ属菌、レジオネラ属菌、抗酸菌の検出用とする。

## (2) 検体処理

### (a) 熱処理法

50°C で 20 分間加熱する。

### (b) アルカリ処理

①等量の 4 %NaOH を加えて Vortex mixer

で攪拌する。

②室温で 20 分間処理する。

③その間時々震盪・攪拌する。

・非処理濃縮検体の浮遊液の 1 白金耳(約 20  $\mu$ L) で塗抹標本を作る。→Z-N 染色(抗酸菌用)

・非濃縮検体は選択培地に未処理のもの 100  $\mu$ L、加熱処理したものを 100  $\mu$ L 塗布する。その際、適宜 10 倍希釈で 2~3 段階希釈し、それぞれ 100  $\mu$ L 塗布しておくこと菌数の算定がし易い。雑菌汚染がひどいと考えられる検体では熱処理後さらに低 pH 処理する。

## 2. レジオネラ属菌について

### (1) 培養

ビオメリュー社の GVPC プレートに接種(アクアス、静岡県環境衛生科学研で使用。36  $\pm$  1°C で 10 日まで培養する。2、3 日ごとに観察する。

### (2) 確認培養

レジオネラ様のコロニーを血液寒天プレートで確認培養。

### (3) 同定

長波紫外線による自発蛍光をみる。

自発蛍光がないなら、

デンカ生研のレジオネラ免疫血清 7 種(Lp1-6, micdadei) でスライド凝集反応。

自発蛍光があるなら、

デンカ生研のレジオネラ免疫血清 3 種(bozemanii, gormanii, dumoffii) でスライド凝集反応。

スライド凝集反応陰性(あるいは弱い反応)のものについて、

1) PCR により mip, 5SrRNA を増幅して *L. pneumophila* かその他のレジオネラ属菌かの確認。ここで OXOID のラテックス凝集反



応 (Lp2-14、他のレジオネラ属菌 7 種 ) をしてもよい。

2) 1) で mip 陰性の菌について、極東 DDH で種の同定。

3) 1) で mip 陽性の菌についてデンカ生研のレジオネラ免疫血清 9 種 (Lp7-15)

4) 2) 及び 3) で陰性の菌について、16SrRNA の配列決定による同定。

### 3. 抗酸菌について

#### (1) 培養

上記処理検体 0.1 mL ずつを 2~3 本の 2% 小川培地 (極東製薬工業) に接種後  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で 8 週間まで培養する。コロニーを計数する。約 1 週間でコロニーの検出できる菌種とそれ以降にコロニーの見られる菌種がある。

#### (2) 分離菌の純化

滅菌精製水にて分離菌の微濁浮遊液を 10 倍希釈系列で希釈し、それぞれ 0.1 mL ずつ Middlebrook 7H10 寒天培地に接種し、5% CO<sub>2</sub> フランキ内  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で 2~3 週間培養後、単コロニーを釣菌し、Middlebrook 7H9 broth (4 mL) にて増菌し  $4^\circ\text{C}$  に保存する。

#### (3) 同定

上記純化菌を接種した 1% 小川培地あるいは Middlebrook 7h9 broth 培養菌を供試菌として、培養・生化学的性状・DDH・塩基配列決定などの方法により同定試験を行う。

### 4. 一般細菌について

標準寒天培地を用いて  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間培養する。

#### 今後の検討

1) Sample を神奈川県内協力歯科医院 3ヶ所から採取する。(5, 6月)

2) Sample を国立感染症研究所に輸送し、菌の同定を行う。(5, 6月)

3) 結果をまとめ大規模の研究計画を立てる。(7, 8月)

4) 協力歯科医院の募集を行う。(9, 10月)

5) 大規模研究を開始。(11, 12、平成18年1月)

#### 考察

今回、歯科医院内デンタルユニット内循環水のサンプルを採取して、細菌およびレジオネラ、原虫、抗酸菌を測定する検査システムを確立することができた。この方法を用いれば、より正確に容易に測定することが可能である。17年度は、実際に測定する歯科医院を増やし、どの程度それらの微生物に汚染されているか検討する予定である。

#### 結論

歯科医院内デンタルユニット内循環水の微生物を正確に検出同定する方法を確立した。この方法は、デンタルユニット内の微生物汚染状況を的確に把握するための方法として有用である。

#### 研究成果発表

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）  
分担研究報告書

バイオフィルム検査およびその検討

分担研究者 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）  
研究協力者 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）  
門田 晃一（岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 助手）  
上原 慎也（岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 助手）  
光畑 律子（岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学技術補佐員）

研究要旨

バイオフィルム感染症の予防法・治療法を確立するためには、実験モデル系をはじめとする基盤技術の開発が必要不可欠である。また、より有効かつ普遍的な予防法・治療法の確立のためには、基礎的・臨床的問題点を把握することが重要である。

本年度は、日和見感染菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）と腸球菌のバイオフィルム形成能に関して、基礎的および臨床的に検討した成績を論文化した。また、緑膿菌に関しては、キャピラリーフローセルを用いた新しい実験モデル系での検討を中心に行った。その結果、① MRSA の尿路における定着、感染に、*hla*, *hly*, *fna* 遺伝子産物が関与していること、②病原性遺伝子を集積した *Enterococcus faecalis* は、バイオフィルム形成能が高く尿路に定着すること、③キャピラリーフローセルシステムは、抗菌薬を含む抗バイオフィルム剤開発のための新しい実験・評価系になるものと考えられた。

以上の研究成果は、尿路バイオフィルム感染症のみならず口腔バイオフィルム感染症による院内感染の予防法を確立するための礎になる。

A. 研究目的

今日の多彩な院内感染症は、細菌バイオフィルムに起因しているといっても過言ではない。従って、抗バイオフィルム剤の開発は重要な研究課題であり、我々は日和見感染菌のバイオフィルム形成能に関して基礎的・臨床的検討を行うとともに、各種実験モデル系での検討を継続している。本年度は、日和見感染菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）と腸球菌のバイオフィルム形成能に関して、基礎的および臨床的に検討した成績を論文化した。また、緑膿菌に関しては、基礎的および臨床的に検討を行うとともに、キャピラリーフローセルを用いた新しい実験モデル系での検討

も行った。本研究課題の最終目標は、より精密なバイオフィルム解析が可能となるマイクロフローシステムの開発であり、口腔細菌のバイオフィルム形成過程の検討にも有用である。

B. 研究方法

①岡山大学泌尿器科で 1990 年から 2001 年の 12 年間に、尿路感染症患者より分離された MRSA109 株を対象とした。バイオフィルム形成実験は、マイクロプレート法により行い、遺伝子の検出には PCR 法を用いた。

②岡山大学泌尿器科で 1991 年から 2002 年までの 12 年間に、複雑性尿路感染症患者より分離された *Enterococcus faecalis* 352

株を対象とした。病原性に関与する遺伝子と薬剤耐性遺伝子の保有状況およびその伝達性を検討した。またバイオフィルム形成能、ヘモリジンおよびゼラチナーゼの産生性についても検討した。

③ガラスキャピラリー中に緑膿菌バイオフィルムを形成させ、薬剤無添加と薬剤作用後のバイオフィルムについて、蛍光染色キットを用いて生菌と死菌を染め分け、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。また、GFP (green fluorescent protein) 産生緑膿菌株が形成するバイオフィルムの特性を検討した。

### C. 研究結果

①MRSAのうち、*hla*, *hly*, *fnbA*を保有する菌株でバイオフィルム形成能が高かった。カテーテル留置症例から分離されたMRSAは、非留置症例から分離されたMRSAに比べ有意にバイオフィルム形成能が高かった。*hla*, *hly*, *fnbA*の保有率は、カテーテル留置症例から分離されたMRSAにおいて高かった。

②*E. faecalis* 352株のうち315株が *asa1* もしくは *esp* を保有していた。ヘモリジン産生63株およびゼラチナーゼ産生167株の内、*asa1* および *esp* 両遺伝子保有株はそれぞれ59株、94株であった。また *asa1* および *esp* 両遺伝子保有株のバイオフィルム形成能は、いずれも保有しない株に比べて有意に高かった ( $P=0.038$ )。 *asa1*, *cyfA*, *aac(6')-aph(2'')* 遺伝子は菌株間で伝達されており、これらの遺伝子は *asa1* および *esp* 両遺伝子保有株に集積していると考えられた。*asa1*, *esp* のいずれかを保有する株は、カテーテル留置症例および非留置症例のいずれからも分離されていた。

③キャピラリーフローセルシステムは、GFP産生緑膿菌株・非産生株のいずれを用いても、再現性のある実験モデル系として使用可能である。ガラスキャピラリー中に形成された緑膿菌バイオフィルムの厚さそのものは薬剤作用により大きく変化しな

かった。薬剤無添加では緑色が大部分を占め、生菌の分布が確認された。レボフロキサシン単独では、死菌の存在を示す赤色がバイオフィルムの浅層部で観察された。ホスホマイシン単独では、薬剤無添加と同程度の緑色であった。両薬剤併用では、バイオフィルムの深層部まで赤色が観察され、併用効果が認められた。

### D. 考察

①MRSAの尿路における定着、感染に *hla*, *hly*, *fnbA* 遺伝子産物の関与が示唆された。

②病原性遺伝子を集積した *E. faecalis* はバイオフィルム形成能が高く尿路に定着するものと考えられた。

③キャピラリーフローセルシステムは、抗菌薬を含む抗バイオフィルム剤開発のための新しい実験・評価系になるものと考えられた。

### E. 結論

尿路由来MRSAおよび腸球菌に関して、細菌側因子(バイオフィルム形成能、菌体外毒素・酵素の産生性、薬剤耐性、付着・凝集・バイオフィルム形成・病原性に関与する各遺伝子の保有の有無など)と患者側因子(年齢、性別、体温、尿路基礎疾患、留置カテーテルの有無、同時分離菌、使用抗菌剤など)の検討を行った。現在までに構築したデータベースは、新しいバイオフィルム実験モデル系の開発に有用であり、本研究課題を遂行する上での重要な情報である。また、キャピラリーフローセルシステムにおいて確立した方法は、マイクロフローシステムの開発に必要不可欠である。以上の研究成果は、尿路バイオフィルム感染症のみならず口腔バイオフィルム感染症による院内感染の予防法を確立するための礎になる。

### 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Ando E, Monden K, Mitsuhashi R, Kariyama R, Kumon H: Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama* 58(4): 207-214, 2004
- 2) Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H: Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Medica Okayama* (in press)
2. 学会発表
  - 1) 第 78 回日本感染症学会総会 東京 2004, 4. 6-7  
シンポジウム：耐性菌感染症を減らすにはどうするか  
「薬剤耐性菌による尿路バイオフィルム感染症の問題点とその対策」  
狩山玲子, 門田晃一, 公文裕巳
  - 2) 92 回日本泌尿器科学会総会 大阪 2004, 4. 10-13  
「尿路結石における Nanobacteria-like organism の検出と分離」  
公文裕巳, 上原慎也, フェルナンド アバラズア, 門田晃一, 狩山玲子, 松本明
  - 3) 第 52 回 日本化学療法学会総会 沖縄 2004, 6. 3-4  
「新しいバイオフィルム実験モデル系 (キャピラリーフローセルシステム) での抗菌薬の有効性評価」  
益田美和, 狩山玲子, 門田晃一, 公文裕巳
  - 4) 第 18 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会：東京 2004, 7. 3  
「当科にて分離された尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィルム形成に関する検討」  
上原慎也, 益田美和, 光畑律子, 村尾航, 瀬野祐子, 石井亜矢乃, 狩山玲子, 門田晃一, 公文裕巳
  - 5) 第 18 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会：東京 2004, 7. 3  
「ラット緑膿菌尿路感染症バイオフィルムに対する prulifloxacin と fosfomycin の併用効果」  
三國谷雄, 加藤佳久, 疋田宗生, 門田晃一, 狩山玲子, 公文裕巳
  - 6) 第 39 回 緑膿菌感染症研究会 神戸 2005, 2. 4-5  
「緑膿菌バイオフィルムに対するフルオロキノロン系薬とホスホマイシンの併用効果」  
狩山玲子, 三國谷雄, 加藤佳久, 疋田宗生, 門田晃一, 公文裕巳
  - 7) 第 20 回 日本環境感染学会総会 神戸 2005, 2. 25-26  
「メタローβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌による尿路感染症の臨床的検討」  
村尾航, 光畑律子, 瀬野祐子, 上原慎也, 門田晃一, 狩山玲子, 公文裕巳