

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

院内感染における監視体制の構築

分担研究者	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）
研究協力者	犬飼 昌子	（岡山大学医学部保健学科看護学専攻 助手）
	野村 佳代	（岡山大学医学部保健学科看護学専攻 助手）
	千田 好子	（岡山大学医学部保健学科看護学専攻 教授）
	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）
	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）

研究要旨

医療依存度の高い入院患者の口腔ケアおよび院内感染に関する評価システムの構築は重要な研究課題である。本年度より、使用頻度の高い気管内吸引カテーテルへの付着菌およびバイオフィーム形成菌に関する検討を開始した。まず、気管内吸引カテーテルからの細菌の解離方法について検討を行った結果、付着菌を細菌学的に検証する方法としては、超音波処理は必要なく、チューブミキサーによる攪拌で十分であった。ただし、気管内吸引カテーテルのバイオフィーム形成の有無を確認するためには、走査型電子顕微鏡での形態学的観察が必要である。また、在宅療養患者が頻回に使用した気管内吸引カテーテルの細菌汚染状況の検討において、肉眼的汚染状況と付着菌・付着物の間に明らかな関連性を認めなかったため、走査型電子顕微鏡による観察の必要性が示唆された。

以上の検討において、口腔ケアを含めた気管内吸引カテーテルなどの感染管理は、入院患者のみならず在宅療養患者においても必須であり、在宅歯科医療における感染防止システムの構築も、今後の厚生労働行政の重要な課題であると考えられた。

A. 研究目的

医療依存度の高い入院患者の口腔ケアおよび院内感染に関する評価システムの構築は重要な研究課題である。口腔・唾液の検査のみならず、気管内吸引カテーテル（以下、吸引カテーテル）への付着菌およびバイオフィーム形成菌の同定および定量を行うことにより、院内感染における監視体制の構築を目指す。本年度は、まず吸引カテーテルからの細菌解離方法の基礎的検討を行い、続いて使用済み吸引カテーテルからの分離菌の同定とカテーテル付着菌・付着物の走査型電子顕微鏡による形態学的観察

を行った。

B. 研究方法

①滅菌生理食塩水中の吸引カテーテル1cm断片からの細菌解離方法として、超音波処理（Bioruptor UCD-200型、出力200ワット）およびチューブミキサー処理を行った。

②人工呼吸器を装着した在宅療養患者が使用した吸引カテーテルが収集され、チューブミキサーで処理後、種々の寒天培地（普通寒天培地〔一般細菌用〕、卵黄加マンニット食塩培地〔ブドウ球菌用〕、DHL寒天培地

〔腸内細菌用〕、PASA 培地〔緑膿菌用〕で培養し、菌数測定および同定を行った。また、走査型電子顕微鏡により、吸引カテーテル付着菌・付着物の形態学的観察を行った。

C. 研究結果

①超音波処理時間を検討した結果、処理1分以上で細菌が死滅した。処理なしと処理30秒では、解離した菌数に大きな差を認めなかった。

②今回検討した17本の吸引カテーテルのうち、11本から菌が検出された。同定された菌種のうち、2本以上から分離されたものは、*Burkholderia cepacia* 4本、*Pseudomonas aeruginosa* 3本、*Xanthomonas maltophilia* 3本、*Alcaligenes xylosoxidans* 2本、*Staphylococcus capitis* 2本であった。

培地上に菌が検出された吸引カテーテルでは、走査型電子顕微鏡でも菌を発見することができた。桿菌であればおよそ1.5~2.0 μm 、球菌であればおよそ1.0 μm のものが見られたが、ほとんどが桿菌であった。特に吸引カテーテルの内側によく見られ、1,000倍で探して画面におよそ2~3見つかる程度であった。注目すべきは、3本の吸引カテーテルでは、付着物の中に菌が埋もれていて、バイオフィルムの形成が確認できた。走査型電子顕微鏡で菌が見られなかった吸引カテーテルでも付着物は多く見られたが、肉眼的汚染状況と付着菌・付着物の間に明らかな関連性を認めなかった。

D. 考察

使用頻度の高い吸引カテーテルを口腔を介して長期使用された医療器具と見立てて細菌汚染状況の実態把握を行うことは、口腔ケアおよび歯科治療を含めた院内感染防止システムの構築に繋がると考えられる。吸引カテーテルの付着菌を細菌学的に検証する方法として、文献上超音波処理が行なわれているものの、その実験方法の詳細ま

では記載されていない。我々の検討において、吸引カテーテルからの細菌解離方法として、超音波処理を1分以上行くと、細菌が死滅することが明らかになった。処理30秒と処理なしにおいて細菌の解離に大きな差を認めなかったため、チューブミキサーによる攪拌のみで十分と考えられた。細菌の培養・同定のみでは、吸引カテーテルへの細菌の付着状況を十分に把握できないため、走査型電子顕微鏡での形態学的観察を行った。その結果、細菌の付着とバイオフィルム形成を判別することが可能であった。肉眼的汚染状況と付着菌・付着物の間に明らかな関連性を認めなかったため、走査型電子顕微鏡での観察は重要であると考えられる。

E. 結論

吸引カテーテルの付着菌を細菌学的に検証する方法として、超音波処理は必要なく、チューブミキサーによる攪拌で十分であった。ただし、吸引カテーテル内のバイオフィルム形成を確実に把握するためには、走査型電子顕微鏡での形態学的観察が必要であった。以上の検討において、口腔ケアを含めた気管内吸引カテーテルなどの感染管理は、入院患者のみならず在宅療養患者においても必須であり、また使用頻度の高い吸引カテーテルを口腔を介して長期使用された医療器具と見立てて細菌汚染状況の実態把握を行うことは、口腔ケアおよび歯科治療を含めた院内感染防止システムの構築に繋がると考えられた。

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)
 - 3) 犬飼昌子、野村佳代、渡邊久美、千田好子、光畑律子、狩山玲子. 気管内吸引カテーテル付着菌の解離方法に関する検討. (投稿中)
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ー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
「新しいバイオフィーム実験モデル系 (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ー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ームに対する 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
「緑膿菌バイオフィー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

気管内吸引カテーテル付着菌の解離方法に関する検討

犬飼昌子¹⁾ 野村佳代¹⁾ 渡邊久美¹⁾ 千田好子¹⁾ 光畑律子²⁾ 狩山玲子²⁾

1)岡山大学医学部保健学科看護学専攻

2)岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学

I はじめに

開放式システムによる気道分泌物の吸引では、滅菌された使い捨ての気管内吸引カテーテル(以下、カテーテル)を単回使用すること^{1), 2)}が推奨されている。しかし、経済的あるいは医療廃棄物の増加といった理由でカテーテルを繰り返し使用する場合もある^{3), 4)}。

再利用する場合のカテーテル管理は感染管理上重要であり、研究的取組みも多くみられる。それらは、カテーテルの浸漬用消毒剤の細菌汚染状況やその対策についての報告^{5)~9)}がほとんどで、カテーテルそのものの細菌汚染状況やその研究方法について具体的に言及したものは少ない。

カテーテルの細菌汚染状況を調べる方法のひとつにカテーテルを生理食塩水(以下、生食)中に入れて、超音波処理し、付着菌を解離させる方法がある⁵⁾。しかし、通常超音波処理は、細胞・バクテリア・組織等の破碎目的に用いられているため、カテーテル付着菌を生菌として解離できるかどうか疑問を抱いた。

今回、超音波装置および試験管ミキサーを使用して、カテーテル付着菌の解離を試み、生菌の検出法を検討した。さらに、走査型電子顕微鏡(以下、電顕)を使用して、カテーテル付着菌・付着物の形態学的観察を行った。

II 方法

1. 材料

カテーテルは全て 2 側孔・先端開口で 12Fr. (ポリ塩化ビニール製, トップ K.K.) を使用した。

i) 臨床分離株を付着させたカテーテル

無菌操作で、滅菌済みカテーテルの先端側孔部分を切断して除き、続いて 1 cm ずつ 20 個の断片とし、それらを 10 ml の液体培地(乾燥ブイヨン;ニッスイ)中に浸漬させた。その中に 3 菌種(*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) を接種した 1 夜培養液 0.5 ml を入れ、恒温振とう培養器(Bio Shaker BR-13FP;TAITEC)で 37°C、18 時間培養し、カテーテル断片に菌を付着させた。

ii) 入院中および在宅療養中の患者に使用したカテーテル

入院患者に単回使用したもの 1 本および在宅療養患者に頻回に使用したもの 3 本(1 本/1 患者)を回収した。

2. カテーテル付着菌の解離方法

i) 臨床分離株を付着させたカテーテル

生食 1 ml 入りポリプロピレン製試験管(10 ml、以下、試験管)を 4 本準備した。上述

のように3菌種の臨床分離株を付着させたカテーテル断片を生食で洗浄後、それぞれの試験管に 5 個ずつ入れた。これらをサンプル密閉式超音波細胞破碎装置 (Bioruptor UCD-200 型; 東湘電気 K.K.) で超音波処理(周波数 20 kHz、出力 200 W) した。処理時間は、0 分、0.5 分、5 分、10 分とし、処理後は各 30 秒ずつ試験管ミキサー(TUBE MIXER TRIO HM-2F; アズワン)で攪拌し、これを菌液とした。実験は 2 回実施した。

ii) 入院患者に単回使用したカテーテル

実際に患者に使用したカテーテルから付着菌を解離するために、生食 1 ml 入り試験管を 3 本準備し、それぞれに 1 cm のカテーテル断片を 2 個ずつ入れた。超音波処理は 0 分、0.5 分、1 分に時間設定をして行った。処理後は各 30 秒ずつ試験管ミキサーで攪拌し、これを菌液とした。実験は 2 回実施した。

iii) 在宅患者が繰り返し使用したカテーテル

3 人の在宅患者が再利用しながら使用したカテーテルを、それぞれ先端から約 1 cm ずつ 10 個の断片に切断し、準備した 3 本の生食 5 ml 入り試験管に入れた。これらを試験管ミキサーで 30 秒攪拌し、菌液とした。

3. 生菌数の測定

上記の方法で調製した菌液を、10 倍希釈法(10^{-1} ~ 10^{-5})で希釈し、それぞれの試験管から 100 μ l ずつ一般細菌用普通寒天培地(ニッスイ)に接種し、37°C、18 時間培養後、生菌数を測定した。

4. 走査型電子顕微鏡での観察

既述の 3 人の在宅患者が使用したカテーテルの断片(約 0.5 cm)を 1%グルタール

アルデヒドに浸漬し、1%四酸化オスミウムで二重固定後、アルコール脱水をして自然乾燥させ、内側を上にして試料台に張り付け蒸着を行った。試料は電顕(S-570型; 日立製作所)で観察した。

III 結果

1. 超音波処理による付着菌の解離

臨床分離株を付着させたカテーテル5 cm分から生食1 ml中に解離された生菌数を測定した。処理時間が0分、0.5分では、生菌数(CFU/ml)はそれぞれ 1.21×10^6 、 1.33×10^6 (実験1)、 2.93×10^6 、 1.53×10^6 (実験2)であった。2回とも0.5分を過ぎると生菌数は減少をはじめ5分経過すると0分、0.5分に比しておよそ2オーダーの減少を認めた(図1-A)。また、実際に患者に使用したカテーテル2 cm分から生食1 ml中に解離された生菌数(CFU/ml)は、処理時間が0分では 3.82×10^5 (実験1)、 1.00×10^5 (実験2)で、0.5分では 1.45×10^5 (実験1)、 4.91×10^5 (実験2)であった。2回とも0.5分を経過すると菌数は減少をはじめ、1分を経過すると0分に比しておよそ1オーダーから2オーダーの減少を認めた(図1-B)。

2. 試験管ミキサーを用いての付着菌の解離と形態学的観察との関連性

在宅患者に使用したカテーテルの外観に汚染を認めたものの、生菌が検出されなかったカテーテルは、電顕観察でも細菌を認めなかった。ただし、多くの付着物が観察された(図2-A)。これに対してカテーテル外観の汚染は認めないが、カテーテル10 cm分に 1.3×10^3 (CFU/ml)の生菌が検出されたものは、電顕観察で短桿菌の

細菌が部分的に存在していた(図2-B)。また、カテーテル 10 cm分に 2.5×10^4 (CFU/ml)の生菌が検出されたカテーテルは、外観の汚染も認め、電顕観察で重層化した付着物と球菌および桿菌が散在し、一部集塊状の菌体が観察された(図2-C)。

IV 考察

物質表面の細菌汚染状況を検討する方法にはふき取り法、スタンプ法、そして洗浄液を培養する方法^{7), 10)}などがあるが、これらの方法ではカテーテル内側からの付着菌採取は困難である。そこで付着菌を生食に解離する方法を検討した。まず、超音波法で付着菌の解離を試みたが、0.5分以上超音波処理を行うと付着菌を解離する際に細菌が死滅する可能性が示唆された。Jengら¹¹⁾は20分間の超音波処理でも生菌数が減少しないという結果を示しているが、これは今回の臨床分離菌とは異なった芽胞菌等を対象にした実験であり、細菌の種類やその特徴により、超音波処理の条件設定が必要であると考えられた。

試験管ミキサーを用いてカテーテルの付着菌を解離させた結果、測定された生菌数と電顕で観察された形状に関連性がみられたことから、カテーテル付着菌の解離には生食中に入れたカテーテルの断片を攪拌するのみで十分であることが明らかになった。しかし、重層化した細菌の付着を認めたカテーテルも存在し、バイオフィルムが形成される可能性もあるため、細菌学的な検討とあわせて電顕を用いた形態学的な評価が重要であることが示唆された。

V 結論

1. カテーテル付着菌の解離に超音波処理を用いた場合、処理時間が 1 分を経過すると顕著に生菌数の減少を認めた。
2. カテーテル付着菌の解離方法は、生食に入れたカテーテルを試験管ミキサーで攪拌するのみで十分である。
3. カテーテルの汚染状況を評価するには、細菌学的検討と併せて電顕での形態観察が重要である。

VI 謝辞

稿を終えるにあたり、カテーテルの収集にご協力頂いた病棟および訪問看護ステーション看護師の皆様にお礼を申し上げます。また研究遂行にあたり電顕観察にご協力頂いた岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学大野勝雄技術専門職員に深謝いたします。

なお、本研究は平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金(H16-医療-014)による医療技術評価総合研究事業の助成を受けて行った。

VII 文献

- 1) CDC: Guidelines for Preventing Health-Care-Associated Pneumonia, 5-11, 2003.
- 2) 日本看護協会: 感染管理に関するガイドブック改訂版. 36-37, (社)日本看護協会, 東京, 2004.
- 3) 逢坂範子: 気管内吸引-吸引カテーテルの適正使用-. 看護管理, 10(6):446-450, 2000.
- 4) 渡邊久美, ほか: 気管内吸引を必要とする在宅療養患者の感染管理の実態. 岡山大学医学部保健学科紀要, 15(2):1-7, 2005.
- 5) 尾家重治, ほか: 気管内吸引チューブの微生物汚染とその対策. 日本環境感染誌, 8(1):15-18, 1993.
- 6) 堀勝幸, ほか: 当院における消毒剤有効テストの試み-口腔内および気管内吸引チューブを中心に-. INFECTION CONTROL, 10(12):1262-1264, 2001.
- 7) 小森由美子, ほか: 看護・在宅介護の現場における吸引カテーテルと消毒剤の取り扱いに関する指導マニュアルの検討. 医療薬学, 28(5):478-483, 2002.
- 8) 諏訪雅宣, ほか: 低濃度エタノールを添加した塩化ベンザルコニウムの殺菌効果. 医学と薬学, 50(2):179-181, 2003.
- 9) 梶浦工, ほか: 逆性石ケン A 液 0.1「ヨシダ」の有用性. 医学と薬学, 51(5): 689-696, 2004.

- 10) 村井貞子:「在宅看護における感染予防に関する指針」作成の基礎的研究.
看護管理, 6(11):827-833, 1996.
- 11) Jeng DK, et al: Importance of ultrasonication conditions in recovery of
microbial contamination from material surfaces. Journal of Applied Bacteriology,
68:479-484, 1990.

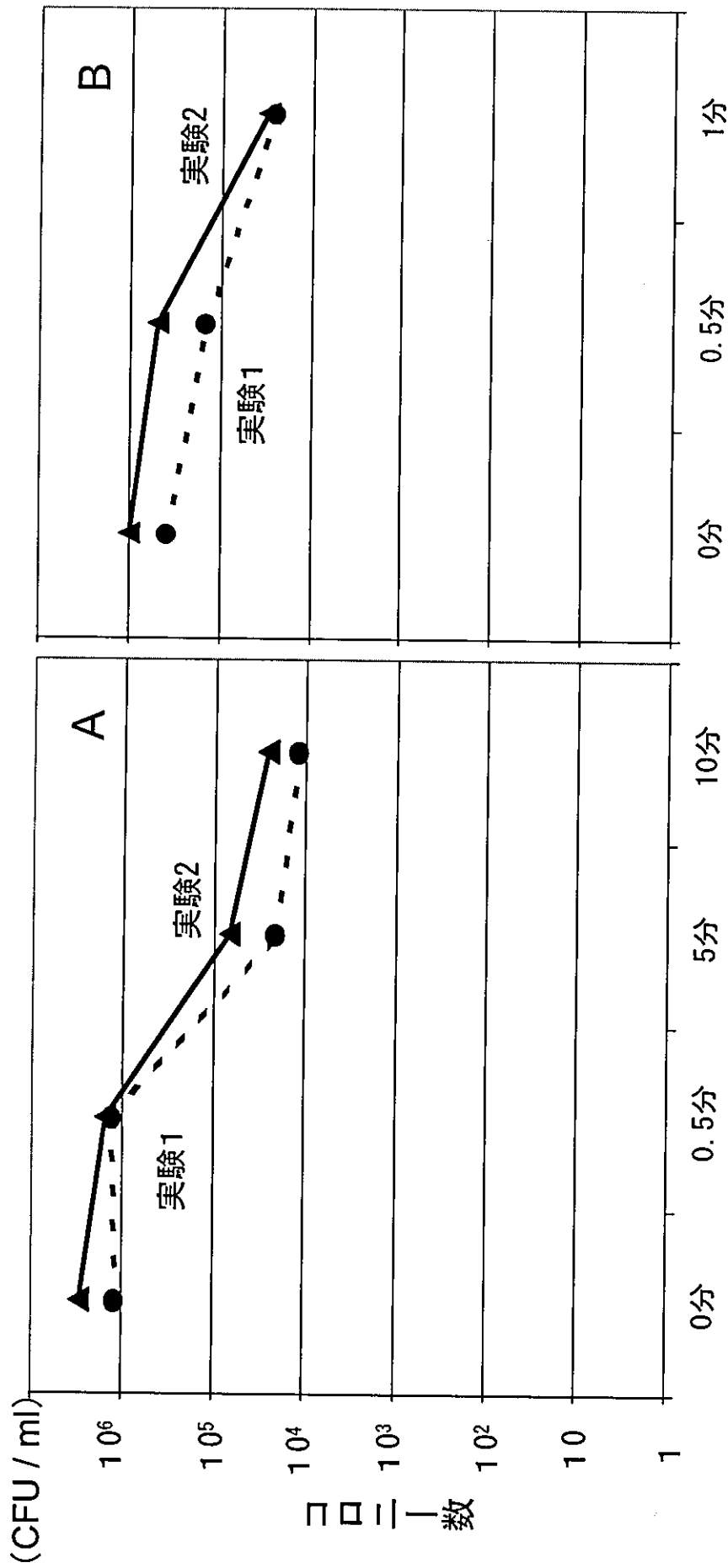


図1 超音波処理時間と生菌数

A 3菌種の臨床分離株付着吸引カテーテル

B 入院患者に使用した吸引カテーテル

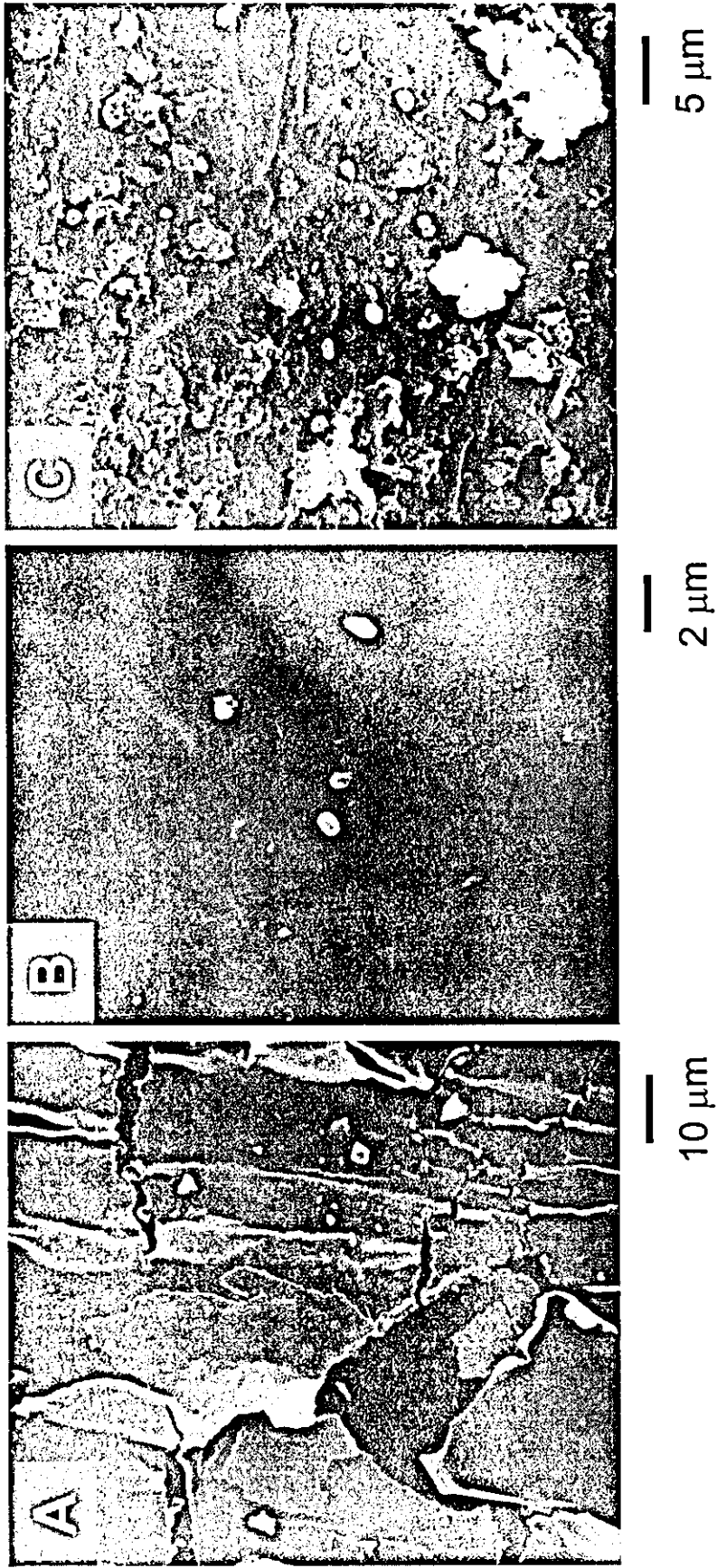


図2 在宅患者に繰り返し使用したカテーテルの走査型電子顕微鏡像

- A 外観汚染が認められるもの、生菌が検出されなかった吸引カテーテル
- B 外観汚染がないにも拘らず、生菌が検出された吸引カテーテル
- C 外観汚染が認められ、生菌が多数検出された吸引カテーテル

歯周病診療における院内感染の検討

分担研究者 高柴正悟 岡山大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨

易感染性宿主に対する歯周病診療における口腔内細菌量の評価方法を確立し、その歯周病診療における院内感染リスクを細菌学的に評価する検討を行った。この方法は、歯周診療の際の飛び散った細菌の測定にも有用であると考えられた。

A. 研究目的

造血幹細胞移植前の白血病患者は大量化学療法および放射線治療などの影響のため、移植前から易感染状態となる。このため、歯周病治療の際に薬剤耐性菌などによる院内感染のリスクも高くなる。我々は、移植期に際して積極的に口腔内管理を行い、二次感染や口腔内細菌を原因とする院内感染の防止に努めている。

我々の研究課題の目的は、歯周診療における院内感染のリスクや予防法を検討することである。本年度は白血病患者を対象として、口腔内細菌量の評価方法を確立するとともに、細菌学的観点から口腔ケアの効果を評価した。

B. 研究方法

1) 口腔内細菌の定量

口腔内細菌の定量にはリアルタイムPCR法を応用した。すなわち、16S rRNA 遺伝子の細菌種に共通な塩基配列からプライマーを設計し、PCR の反応サイクル毎に反応液に添加した SYBR-Green による蛍光発色強度を測定した。あらかじめ菌数を測定したサンプルを用いて標準曲線を作成し、サンプル中の細菌

数を定量した。

2) 被験者ならびにサンプリング法

岡山大学医学部・歯学部附属病院の血液腫瘍内科で造血幹細胞移植を行った患者9名を対象とし、直径1cmの円内の頬粘膜上について細菌を滅菌綿棒で採取した。

（倫理面への配慮）

岡山大学大学院医歯学総合研究科倫理審査委員会には口腔内細菌検査実施にあたって前もって届け出を行い、承認を受けている。

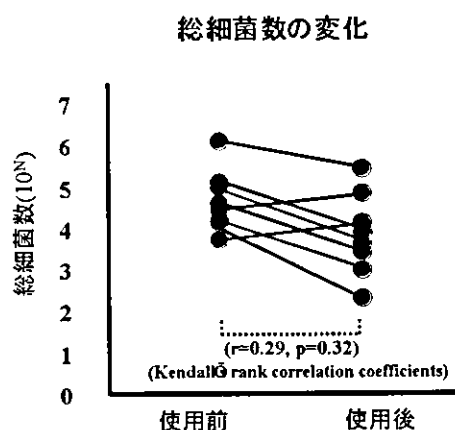
被験者である患者には本研究の趣旨をよく書面と口頭で説明し、サンプル採取にあたっての承諾を得た。

3) 口腔内細菌種の同定

頬粘膜上の細菌について一般細菌培養検査を行い、優勢菌を同定した。サンプリングは口腔ケア（2週間の保湿ジェル使用）の前後で行った。

C. 研究結果

以下の図のように、細菌数は減少し、細菌叢も変化した。



細菌叢の変化

菌種	(n=9)	
	使用前	使用後
常在菌		
α- <i>Streptococcus</i> spp.	9	5
γ- <i>Streptococcus</i> spp.	1	3
<i>Neisseria</i> spp.	9	3
coagulase negative <i>Staphylococcus</i>	0	6
<i>Stenotrophomas maltophilia</i>	0	1
真菌		
<i>Candida albicans</i>	1	0
<i>Torulopsis (=Candida) grabrata</i>	1	0

D. 考察

易感染性宿主における口腔内細菌数を定量するための方法として細菌 16S rRNA 遺伝子を指標とするリアルタイム PCR 法を確立した。この方法を用いて口腔ケアを受けた白血病患者の口腔内細菌量を測定した結果、口腔内細菌量は口腔ケアによって減少傾向となり、院内感染のリスクを軽減できる可能性が示された。

リアルタイム PCR 法を使用して口腔内細菌数を定量するための方法を確立した。口腔ケアにより易感染性宿主である白血病患者の口腔内細菌量は減少傾向となり、院内感染のリスクを軽減できる可能性が示された。また歯周診療の際の飛び散った細菌の測定にも有用であると考えられた。ただし、症例数が少ないため、細菌叢の変化については追加検討の余地を残した。

E. 結論

易感染性宿主における口腔内細菌数を定量するための方法として細菌 16S rRNA 遺伝子を指標とするリアルタイム PCR 法を確立した。この方法を用いて口腔ケアを受けた白血病患者の口腔内細菌量を測定した結果、口腔内細菌量は口腔ケアによって減少傾向となり、院内感染のリスクを軽減できる可能性が示された。またこの方法は、歯周診療の際の飛び散った細菌の測定にも有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiroshi Maeda, Susumu Kokeyuchi, Chiyo Fujimoto, Ichiro Tanimoto, Wakako Yoshizumi, Fusanori Nishimura and Shogo Takashiba. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2005 Feb 1;43(2):233-9.

2. 学会発表

日本歯周病学会 2004 年秋季学術大会 (第 47 回) 日本歯周病学会会誌 第 46 巻 秋季特別号 p. 215 平成 16 年 9 月

日本歯科保存学会 2004 年秋季学会(第 121 回) 日本歯科保存学雑誌 第 47 巻 秋季特別号 p. 220 平成 16 年 11 月

ちゅうごく先端医療機器等産業クラスター創出フェア ポスターセッションプログラム
平成 17 年 3 月

H. 知的財産件の出願・登録状況 該当なし

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

研究分担課題名： 全身疾患と院内感染との関与

研究分担者： 西村英紀（岡山大学大学院医歯学総合研究科 歯周病態学分野）

研究協力者： 前田博史、高柴正悟、苔口 進

（岡山大学大学院医歯学総合研究科 歯周病態学分野、口腔微生物学分野）

研究要旨

社会構造の変化と医療技術の進歩に伴って易感染状況に置かれた患者数は増加の一途をたどるものと想定される。こういった患者層は日和見感染症を容易に生じると予想されるものその実態に関しては不明な点が多い。また口腔の既存の慢性感染巣が新たな感染の focus となる可能性も示唆されている。そこでその実態を明らかにする一端として白血病患者の移植治療時に観察された口腔日和見感染症と考えられる症例を提示し、病態を考察した。またこのような患者の歯科治療を行う際の院内感染リスクの可能性を示唆した。

A. 研究目的

血液悪性疾患の治療に用いられる骨髄移植や臍帯血移植では、強力な化学療法によって白血球数が0となる易感染状態の時期がある。この時期は日和見感染症を容易に生じると予想されるものその実態に関しては不明な点が多い。これは主として倫理的な問題から比較介入研究が困難なことによる。そこで本研究では白血病患者の移植治療時に観察された口腔日和見感染症と考えられる症例を提示し、歯科治療時に歯科用器具に付着の可能性のある微生物感染の病態を考察することを目的とした。

B. 被験者

- 症例1：53歳、女性。急性骨髄性白血病が再発し、臍帯血移植が予定された。口腔内の感染巣の精査目的で歯科へ紹介された。口腔内に自覚症状はないが歯肉の腫脹が著しい。

- 症例2：29歳、女性。急性骨髄性白血病の治療（化学療法）目的で入院。4ヶ月前に上顎左側側切歯の根尖性歯周炎が急性化したため、かかりつけ歯科医院で切開・排膿処置を受けた。レントゲン診査の結果、根尖性歯周炎は直径約6mm程度であった。

C. 経過と考察

症例1では初診時、歯周ポケット長はさほどでもないが、白血病細胞の浸潤と考えられる歯肉の腫脹が著明であった。その時点での白血球数は23,000/・lにも及んだ。大量化学療法と放射線全身照射によって、歯肉の腫脹は著しく軽減した。臍帯血移植後、歯周ポケット内細菌数は増加することなく経過した。しかしながら白血球数0の易感染状態が続いた。歯肉粘膜には腸内細菌 *Enterococcus faecalis* が多量に増殖した。これは典型的な

日和見感染によるものと考えられた。移植幹細胞が生着せず、移植後 14 日目に緑膿菌感染による肺炎で死亡した。

症例 2 では、抗生剤の点滴を行ったにもかかわらず、化学療法開始後（好中球数 0 時）、根尖性歯周炎が再度急性化し、その後瘻孔を形成した。瘻孔より排膿させたところ内容液は滲出液様で非白色であった。これは、この時点での好中球数が 0 であったことに起因するものと考察された。すなわち、白血球や好中球数がほぼ 0 に近いような強力な易感染状態では、慢性炎症巣内の感染細菌が増殖し炎症所見に乏しい急性病変を呈する可能性があること、ひいては感染が拡大すれば全身に波及する可能性も否定できないことが示唆された。本症例では排膿により症状は軽減した。内容液からは *Streptococcus* 族の細菌を検出した。

D. 結論

白血球数や好中球数が 0 になるような著しい易感染状態では、口腔内の日和見感染が容易に起きる可能性が示唆された。また、そのような時期では細菌の増殖によって既存の慢性炎症が急性化する可能性があることが明らかとなった。またこのような患者の歯科治療を行う際、バイオフィーム形成菌である *Enterococcus faecalis* が多量に増殖していることなどから院内感染リスクが高まる可能性を示唆した。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. Maeda H, Kokeguchi S, Fujimoto C, Tanimoto I, Yoshizumi W, Nishimura F, Takashiba S. Detection of periodontal

pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 43(2):233-239, 2005.

2. Kato N, Ohyama H, Nishimura F, Matsushita S, Takashiba S, Murayama Y. Role of helper T cells in the humoral immune responses against 53-kDa outer membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 20(2):112-117, 2005.
3. Yamaguchi M, Nishimura F, Naruishi H, Soga Y, Kokeguchi S, Takashiba S. Thiazolidinedione (Pioglitazone) Blocks *P. gingivalis*- and *F. nucleatum*, but not *E. coli*, Lipopolysaccharide (LPS)-induced Interleukin-6 (IL-6) Production in Adipocytes. *J Dent Res.* 84(3):240-244, 2005.
4. Nishimura F, Soga Y, Iwamoto Y, Kudo C, Murayama Y. Periodontal disease as part of the insulin resistance syndrome in diabetic patients. *J Int Acad Periodontol.* 7(1):16-20, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

LAMP法を用いた口腔細菌新検出法の確立に関する研究

分担研究者 荅口 進 岡山大学大学院医歯学総合研究科 助教授

研究要旨

Polymerase Chain Reaction 法に代わる新しい遺伝子増幅法 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の検出法を確立した。この方法は、飛び散った口腔細菌を短時間で容易に測定することが可能であるため、院内感染の指標の検討に有用である。

A. 研究目的

LAMP 法は栄研化学が開発した PCR 法に代わる安価、迅速、簡易、精確な新しい遺伝子増幅法である。この LAMP 法をこれまで PCR 法により検出・同定していた歯周病細菌 *P. gingivalis* の検査に適用し、簡便で迅速な口腔細菌新検出法の確立を目指し、歯科医療における院内感染防止システムに役立てる。

B. 研究方法

1. 供試菌株：*P. gingivalis* 381, *P. gingivalis* ATCC 33277 およびその他代表的な口腔細菌標準株を用いた。
2. DNA 抽出：サンプルの DNA 抽出は InstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いて行なった。
3. LAMP プライマー設計：*P. gingivalis* の 16S rRNA 遺伝子を標的にプライマー設計ソフト Primer Explorer ver.2 (富士通) を用いて設計した。
4. LAMP 法による DNA 増幅および検出：設計したプライマーと Loopamp DNA amplification kit (栄研化学) を用いて検出感度や特異性を調べた。増幅産物の検出は電気泳動、SYBR Green I での蛍光測定で行なった。

C. 研究結果

20 個の *P. gingivalis* から抽出した DNA を検出限界として LAMP 法では 30 分後に電気泳動、蛍光測定によって増幅産物が検出できた。*P. gingivalis* 以外の菌からは増幅産物はなく、高い特異性を確認した。経時的に蛍光検出を行ない、菌の定量も可能であった

D. 考察

LAMP 法は特異性も感度も高く、さらに定温で反応が行なえ、簡便であることから他の病原細菌の検出に応用できよう。

E. 結論

LAMP 法は病原細菌検出において PCR 法と同様に有用であり、迅速性、簡便性で優れていた。今後、この LAMP 法を用いて他の口腔細菌や日和見感染症の原因菌や薬剤耐性菌に対して簡便で迅速な検出法の開発が期待できる。またこの方法は、飛び散った口腔細菌を短時間で容易に測定することが可能であるため、院内感染の指標の検討に有用である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiroshi Maeda, Susumu Kokeguchi, Chiyo Fujimoto, Ichiro Tanimoto, Wakako Yoshizumi, Fusanori Nishimura and Shogo Takashiba. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2005 Feb 1;43(2):233-9.

荅口 進、前田博史. 口腔微生物フローラと保健. FFI Journal vol. 210, No.4, 2005 掲載予定

2. 学会発表

日本歯科保存学会 2004 年秋季学会 (第 121 回) 日本歯科保存学雑誌 第 47 巻 秋季特別号 p. 220 平成 16 年 11 月

H. 知的財産件の出願・登録状況
該当なし

テーマ

訪問介護時の細菌感染モニタ —特異的細菌のDNA増幅による—
Monitoring Bacterial Infection by DNA Amplification at Visiting Home Care

キャッチコピー

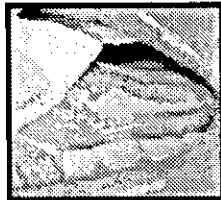
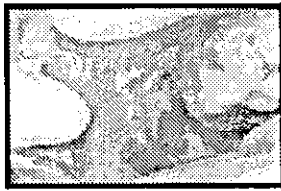
特異的な細菌感染をDNA増幅によってモニタして、訪問介護時の被介護者間の細菌伝播を防ぐ

キーワード

訪問介護, 特異的細菌感染, DNA増幅, LAMP法, 定量検出機器
Visiting home Care; Monitoring bacterial infection; DNA amplification by LAMP method; Quantification

イメージ図

訪問看護時などの
要介護者の口腔粘膜障害例



サンプルを反応液と混ぜて60℃

LAMP法

(Loopamp DNA amplification kit, 栄研化学)

反応時間 ↓ 30分 or 60分

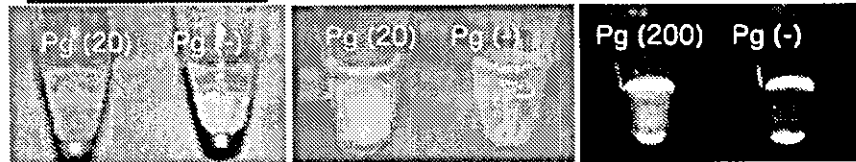
細菌遺伝子の増幅産物の検出



感染あれば、治療へ
(保菌者の迅速検査)

目視判定法

細菌検出は、20個/ml ~



(A)SYBR Green (UV-) (B)SYBR Green (UV+) (C)Mg Pyrophosphate

内容

訪問介護時に触れる体液類から、メチシリン耐性菌、病原性大腸菌(O-157等)、そして結核菌などの特異的細菌を、定温遺伝子増幅法(LAMP法)によって定量的に検出して、被介護者間や介護者への細菌感染を予防することに用いる。定量検出に用いる機器の開発は不十分であるが、既存の定温ブロックを用いるだけでも、体液サンプルを直接反応系に加えることで細菌の検出を30分(長くて60分まで)で判定的に検出できる。そのため、当該被介護者の介護時間中に特異細菌の感染を知ることが可能である。

応用・提携分野

食品製造・調理分野, 獣医学的分野, 学校保健室等の場で応用可能。
特異的細菌の検出に用いるLAMP法用のオリゴヌクレオチドプライマーの設計を栄研化学と実施中。

取得知的所有権

該当なし(ただし、栄研化学の所有は不明)

学校・企業名	岡山大学			
学部・研究室・部課室	大学院医歯学総合研究科 歯周病態学分野			
役職・氏名	教授・高柴正悟			
連絡先	電話	086-235-6675	FAX	086-235-6679
	E-MAIL	stakashi@cc.okayama-u.ac.jp		