

D. 結果のまとめと考察

神奈川県歯科医師会所属歯科医師を対象としたアンケート調査を用いて研修を受けたグループと受けないグループに分け、ユニバーサルプレコーションの理解率におけるグループ間の差を検討した。その結果、ユニバーサルプレコーションの認識において卒業研修を受けたグループが受けてないグループよりも高いことが明らかとなった。一方、出版物による自己研修では、研修効果が認められないことが明らかとなり、大学教育のように講義を受ける研修が院内感染対策の知識を植えつけさせるために有効であることが示唆された。

愛知県歯科医師会所属歯科医師を対象としたアンケート調査を用いて、卒業年度の質問項目を加えた詳細な分析を行った。その結果のまとめを下記に示す。

- 1) HIV 感染者・エイズ患者歯科治療受け入れや HIV 感染者歯科治療紹介受諾などの HIV 患者歯科治療に関して、卒業年数、ユニバーサルプレコーションに関する知識、HARRT に関する知識が強く相関していた。
- 2) 防護用めがね、マスク、グローブ着用や患者ごとのハンドピース交換などの院内感染対策の行動に関わる部分も、卒業年数、ユニバーサルプレコーションに関する知識、HARRT に関する知識が強く相関していた。
- 3) スタッフ教育、感染予防対策研修などの教育、情報の部分は、ユニバーサルプレコーションに関する知識、デンタルユニットのスリーウェイシリンジ中細菌に関する知識と相関していた。
- 4) HBV ワクチン接種は、卒業年数、HIV

感染に関する知識、HIV 感染者歯科治療紹介受諾と相関していた。

これらの結果を総合的に考察すると、ユニバーサルプレコーションに関する意識は大学教育のような講義による研修により向上すること、それが院内感染対策の行動に結びつくことが考えられる。また、すでに卒業した歯科医師に対する卒業研修が重要であることも示唆している。さらに、HIV 感染者に対する歯科治療の受け入れに反映していくことも示唆される。

これらの結果を踏まえ、平成 18 年度は現在神奈川県で行っている神奈川県 HIV 歯科診療体制検討委員会で行っている活動の評価を今まで行ってきたアンケートを用いて再調査を行い、分析後総合的に院内感染対策のマニュアルの作成および卒業研修システムを構築していく。

E. 結論

院内感染対策の意識の向上は、講義を受ける研修に依存しているのが明らかとなり、それが HIV 感染者の歯科治療の受け入れといった行動に結びついていくことが考えられた。大学教育に院内感染対策を盛り込むことと卒業研修を行うシステムの構築が今後重要であることが示唆された。

F. 研究成果発表

1. Senpuku H, Tada A, Uehara S, Kariyama R, Kumon H. Post-operative infection by pathogenic microorganisms in the oral cavity of patients with prostatic carcinoma. *Journal International Medical Research*. in press.
2. 小森康雄, 感染対策の実際; 歯科医院の

ための感染対策実践ガイドライン, p24-98、
監修小森康雄, デンタルダイヤモンド社,
2005年.

3. 小森康雄, ユニバーサルプリコーショ
ンとスタンダードプリコーション; 歯科医
院のための感染対策実践ガイドライン,
p102-105、監修小森康雄, デンタルダイヤ
モンド社, 2005年.

4. 泉福英信, 歯科医療において重要な感
染症の疫学と院内感染対策調査; 歯科医院
のための感染対策実践ガイドライン,
p130-136、監修小森康雄, デンタルダイヤ
モンド社, 2005年.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

別紙 1

厚生労働省科学研究アンケート調査

<回答方法> 下記の設問該当箇所に○を付けてご回答下さい。
また、「その他」をお選びの方はその理由もお書き下さい。

【問 1】

HIV 感染者・エイズ患者(以下 HIV 感染者)之歯科治療についてどうお考えですか。

- (1)特定の歯科医療機関で治療した方がよい (2)全医療機関で受け入れた方がよい
 (3)その他 (理由)

「(1)特定の歯科医療機関で治療した方がよい」と答えた方にお聞きします。その理由は何ですか。

- ①HIV 感染患者の治療は特別な対応が必要だから
 ②専門性が確保できると思うから ③感染防止に係わる経済的問題
 ④その他 (理由)

「(2)全医療機関で受け入れた方がよい」と答えた方にお聞きします。その理由は何ですか。

- ①身近なところで治療した方がよいから
 ②HIV 感染患者の治療は特別な対応が必要ではないから
 ③その他 (理由)

【問 2】

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。

- (1)ある : 人数 人位
 (2)ない

「(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。

- ①事前に認識していた ②事前に認識していなかった

「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

- ア 自分から受診
 イ 保健福祉事務所からの紹介
 ウ 他の医療機関からの紹介
 エ その他 ()

「②事前に認識していなかった」場合、後日 HIV 感染患者だとどのように知りましたか。
 ()

【問3】

B型肝炎、C型肝炎患者の歯科診療はどうお考えですか。

- (1) B型肝炎のみ診療可能 (2) C型肝炎のみ診療可能
 (3) どちらも可能 (4) どちらも不可能

【問4】

今後、保健福祉事務所やエイズ拠点病院、埼玉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。

- (1) 受ける (2) 条件・状況が整備されれば受け入れる
 (3) 受けない (4) 分からない

「(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（複数回答可）。

- ① 職員の合意
 ② 設備の整備
 ③ 感染防止対策
 ④ HIV 感染者の治療に対して、保険点数上の特別加算あるいは行政からの補助があれば考える
 ⑤ 医院側のプライバシー保護
 ⑥ その他（理由 _____）

「(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）。

- ① スタッフの合意が得られない ② 感染防止対策に自信がない
 ③ 他の患者に不安・動揺を与える ④ 現行の保険制度では採算がとれない
 ⑤ プライバシー保護（医院側、患者側ともに）に自信がない
 ⑥ その他（理由 _____）

【問5】

感染対策に対する以下のアンケートにお答えください（複数回答可）

- (1) 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。
①問診表に記載してもらう ②問診で聴取する ③検査を行う ④特にしていない
- (2) 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。
①全てを必ずしている ②全てを時々している
③全てを感染症の患者の時だけしている ④全てはしていない
- (3) オートクレーブを使用していますか
①加熱可能なもの全てに行っている ②全てではないが行っている
③煮沸で代用している ④あまり使用しない
- (4) 消毒薬は主に何を使用していますか
①グルタラル製剤 ②塩素系薬液 ③アルコール製剤
④状況に応じ使い分けている
- (5) 患者ごとにハンドピースを交換していますか
①全ての患者に必ずしている ②時々している
③感染症の患者の時だけしている ④していない
- (6) 他患者に使用した麻酔カートリッジを完全廃棄していますか。
①必ずしている ②時々している ③感染症の患者の時だけしている
④していない
- (7) リキャップ（注射針の再キャップ）はどのようにしていますか
①市販の専用針刺し防止装置を使用している
②自作の針刺し防止装置を使用している
③装置は使用しないが両手ではリキャップしない
④あまり考えたことがない
- (8) 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。
①用意している ②用意しているが滅菌ではない
③患者のピンセットで代用している ④あまり考えたことがない
- (9) 感染対策に関しスタッフ教育をしていますか
①している ②他の問題のついでにしている
③感染症の患者を診るときにしている ④特にしていない
- (10) 感染対策マニュアルを作成していますか
①している ②したいが方法がわからない ③必要性を感じない ④特にしていない

- (11) 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。
- ①研修会に参加 ②会誌、雑誌など出版物で自己研修
③研修を受けたかったが、その機会がなかった ④特に気にせず受けていない
- (12) 「ユニバーサルプリコーション」とは何か知っていますか
- ①聞いたことがない ②聞いたことがあるが良く分からない ③理解している
④感染対策の基本ということは知っている
- (13) 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？
- ①感染する ②感染しない ③血液が混じれば感染する
- (14) 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？
- ①感染する ②感染しない
- (15) 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？
- ①10cm ②1m～2m ③10m
- (16) 歯科治療後の手指消毒の際に、消毒液を使用しますか？
- ①いつも使用している ②時々使用している ③使用していない
④手指の洗浄はしない ⑤その他
- (17) インフルエンザワクチン接種を行いますか？
- ①毎年行っている ②ときどき行っている ③行なったことがない
- (18) B 型肝炎ワクチン接種を行ったことがありますか？
- ①ある ②ない
- (19) 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？
- ①用意している ②用意していない ③これから用意する ④N95 マスクを知らない
- (20) HIV 感染者へ対する HAART 療法を知っていますか？
- ①知っている ②言葉は知っているがどんなものか知らない ③知らない
- (21) 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
- ①知っている。 ②知らない
- (22) 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？
- ①設置している ②設置していない ③設置する予定である。

ご協力有難うございました

図1 卒後研修の院内感染対策に対する効果

質問:「ユニバーサルプリコーション」とは何か知っていますか？

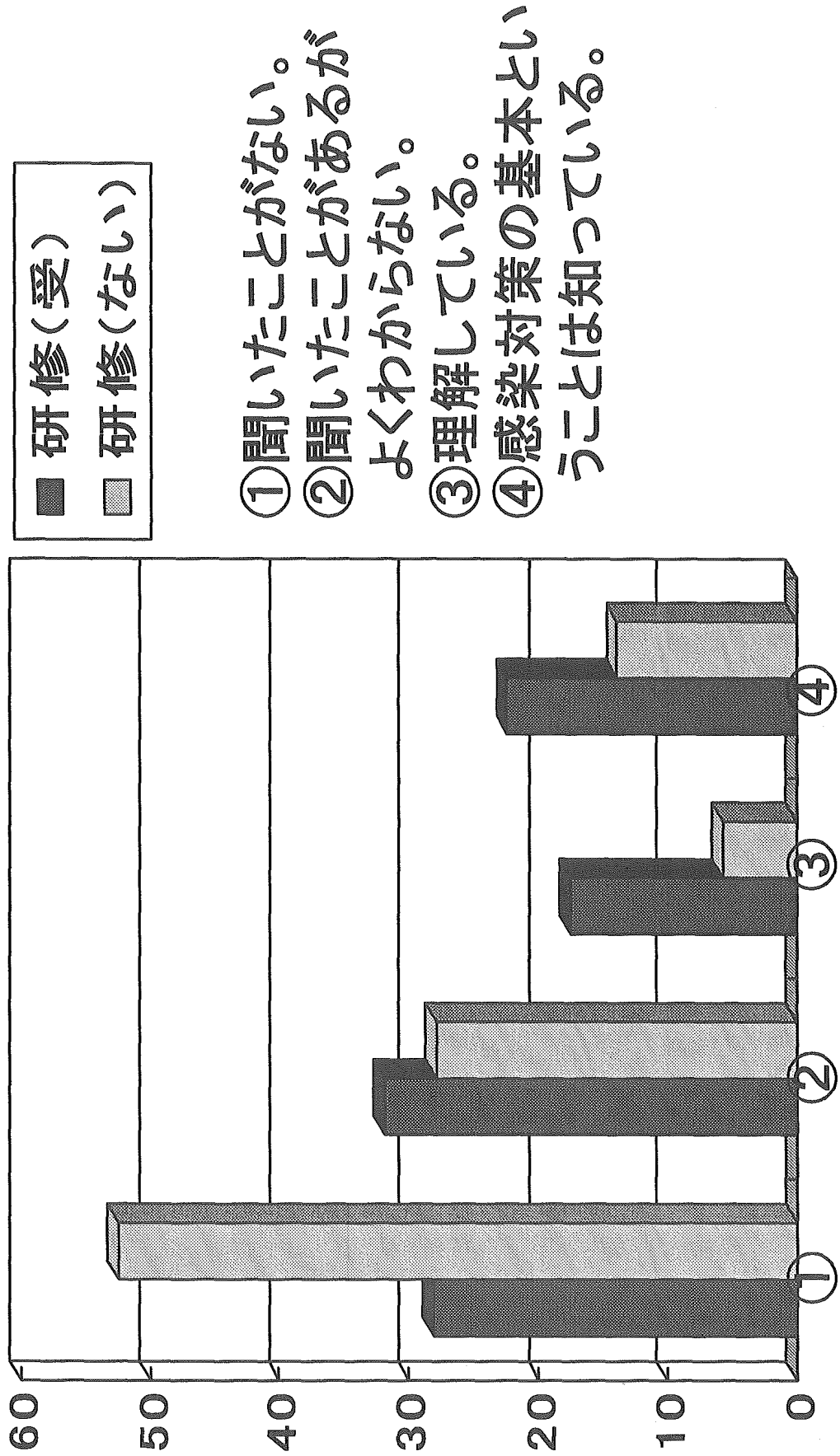


図2 自己研修の院内感染対策に対する効果

質問:「ユニバーサルプリコーション」とは何か知っていますか？

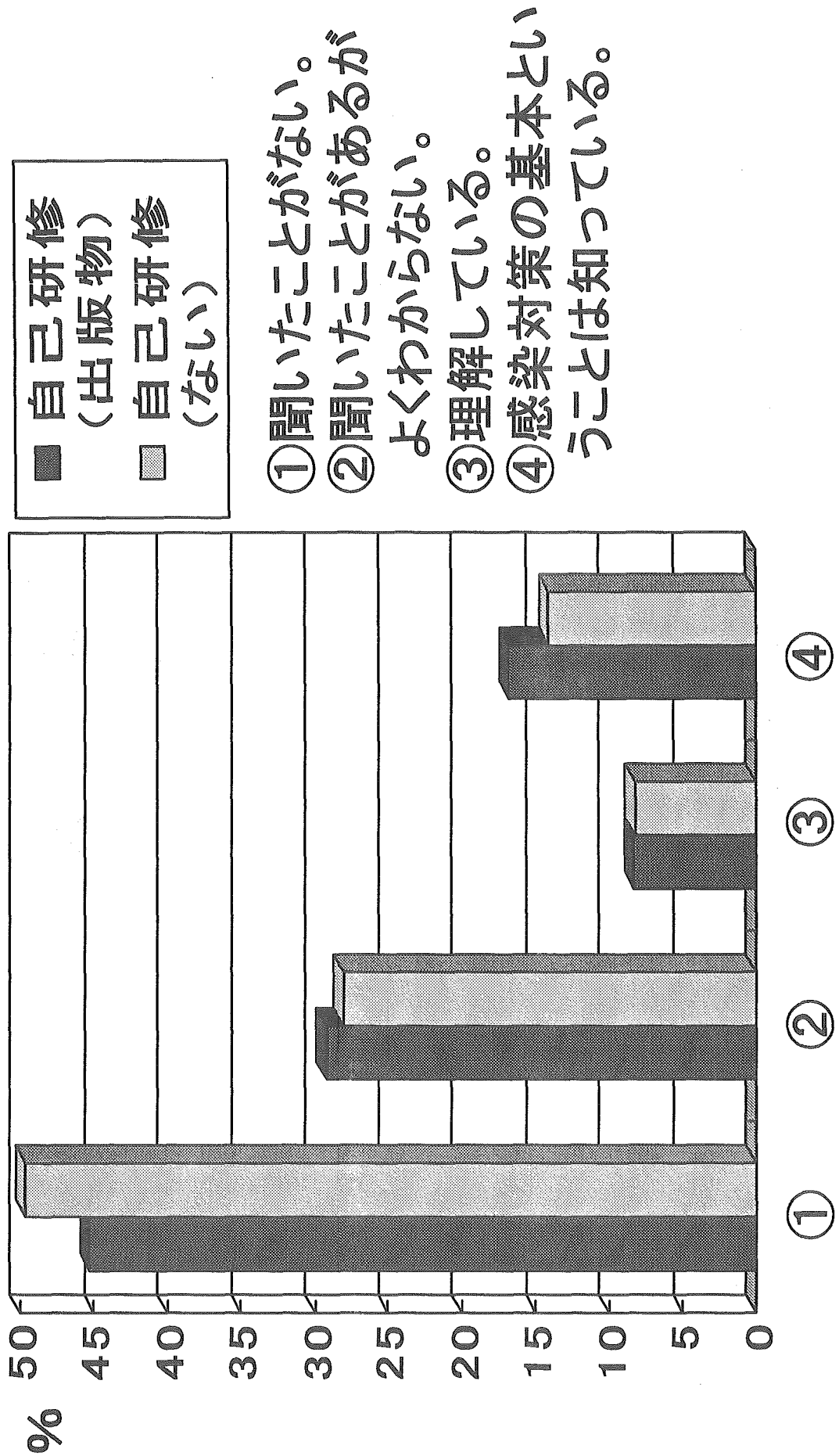


表1 「ユニバーサルプリコーションとは何か？」の質問に対する答えと
大学卒業年度との関係

| | | 大学の卒業年度 | | | | |
|----|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| | | 昭和40年 以前 (n=118) | 昭和41 ～50年 (474) | 昭和51 ～60年 (829) | 昭和61年 ～平成7年 (451) | 平成8年 以降 (66) |
| 1. | 聞いたことがない。 | 66 (55.9%) | 254 (53.6%) | 481 (58.0%) | 246 (55.9%) | 29 (43.9%) |
| 2. | 聞いたことがあるが よくわからない。 | 29 (24.6%) | 130 (27.4%) | 218 (26.3%) | 117 (25.9%) | 20 (30.3%) |
| 3. | 理解している。 | <u>6 (5.1%)</u> | <u>17 (3.6%)</u> | <u>45 (5.4%)</u> | <u>38 (8.3%)</u> | <u>6 (9.1%)</u> |
| 4. | 感染対策の基本とい うことはしている。 | 17 (14.4%) | 73 (15.4%) | 85 (10.3%) | 50 (11.1%) | 11 (16.7%) |

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：平成 16 年度の検討により、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の、一般細菌、従属細菌、緑膿菌、大腸菌、レジオネラ、黄色ブドウ球菌、非結核性非定型抗酸菌、原虫を測定する微生物同定方法を確立することができた。これらの方法を用いて、平成 17 年度は神奈川県内 3 施設において、製造後使用開始してから 12 年以上経過しているデンタルユニットの水サンプルを用いた検討を行った。施設 A, B, C とともに、一般細菌や緑膿菌、大腸菌などの病原細菌は検出できず、正常な免疫応答有するヒトでは病原性となることはほとんどない従属細菌だけが 1 部検出された。本研究のように微生物同定方法が確立したことで、今後サンプル採取施設を増やし、デンタルユニット内配水の微生物汚染に対する意識の向上させるための検討を行う必要がある。

目的：

歯科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。近年では、抗生物質に耐性あるいは低感受性細菌や日和見菌のような弱毒菌による口腔内での集団出現や SARS のような新規ウイルスの唾液を介する伝播などが起り、歯科医療において院内感染を限りなく防ぐための研究を行う必要がある。

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、歯科用ユニット内循環水における有効な微生物汚染検査システムあるいはツールを開発し、それらの方法を利用してさらにデータの蓄積を行い、歯科用ユニット内循環水における院内感染を客観的に評価し、歯科医療において行動の伴う院内感染防止システムを確立することを目的とする。

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 μ 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 μ L、加熱処理したものを 100 μ 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 μ 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

バイオメリュー社の 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
±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±1°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%
CO₂ フランキ内 36±1°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°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±1°C、24±2 時
間培養する。

5. 従属栄養細菌について

従属栄養細菌数は R2A 寒天培地を用いて
20°C、42°C で 7 日間培養する。

6. 黄色ブドウ球菌について

1) 試料 10ml、1ml および 0.1ml を食塩加え
(7.5%) トリプトソイブイオン各 3 本ずつに
接種する。試料 10ml は倍濃度の培地 10ml
に接種する。35°C、24~48 時間培養する。

2) 培養後、1 白金耳を卵黄加マンニット食
塩寒天培地に接種し、35±1°C、48±3 時間
培養する。

2) 卵黄反応陽性、カタラーゼ陽性、コアグ
ラーゼ陽性菌を黄色ブドウ球菌とし、MPN
法により菌数を求める。

7. 大腸菌について

- 1) 試料 10ml、1ml および 0.1ml をコリラート培地各 3 本ずつに接種する。
- 2) 35±1°C で 24±2 時間培養し、黄変したものを大腸菌群陽性、紫外線 (385nm) 下で蛍光のある場合を大腸菌陽性とする。
- 3) MPN により菌数を求める。

試料の採取

施設 A の昭和 63 年 7 月製造、施設 B の平成 4 年 5 月製造、施設 C の平成 2 年 4 月製造のデンタルユニットのスリーウェイシリンジおよびタービンから、月曜日の朝、診療開始前にそれぞれ 500ml の水を採取する。また、コントロールとして各施設の水道水も併せて 500ml 採取する。試料を遠心にて 100 倍に濃縮し、上述の検出法にて微生物の定量的な検討を行う。

結果

施設 A からのタービンからの水において従属細菌 (20°C 培養) 34080/ml が検出された。一方、水道水において従属細菌 (20°C 培養) 1740/ml が検出された。その他の上述の微生物は、検出することが出来なかった (表 1)。

施設 B からの水において、検出を行った上述の微生物は検出することが出来なかった (表 1)。

施設 C からの水道水において従属細菌 (20°C 培養) 2080/ml が検出され、スリーウェイシリンジからの水で従属細菌 (42°C 培養) 540/ml、水道水で従属細菌 (42°C 培養) 20/ml が検出された。その他のサンプルでは上述の微生物は、検出することが出来なかった (表 1)。

考察

平成 16 年度において、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、一般細菌、従属細菌、緑膿菌、大腸菌、レジオネラ、黄色ブドウ球菌、非結核性非定型抗酸菌、原虫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。平成 17 年度は神奈川県内 3 施設において、製造後使用開始してから 12 年以上経過しているデンタルユニットの水サンプルを用いた検討を行った。施設 A, B, C ともに、一般細菌や緑膿菌、大腸菌などの病原細菌は検出できず、従属細菌だけが 1 部検出された。配管内バイオフィーム微生物は、大きく分けて細菌、真菌、原虫などであることがわかっている。これらの微生物の供給源は、水道水、歯科ユニット周囲の環境、ヒト口腔からの微生物、唾液や血液などが考えられている。具体的な微生物は、その大半が水中従属栄養細菌で、これらは正常な免疫応答をする能力のあるヒトには、病原性となる可能性はほとんどない。さらに口腔常在菌、ヒト病原菌 [緑膿菌、レジオネラ菌類および非結核性抗酸菌類などが分離されている。とくにレジオネラは、エアロゾルに運ばれ感染を促していくのでタービンを使用する時は注意を払う必要がある。一方病原性微生物は検出された数例が示められているだけでほとんど検出されない場合も多く、また日本で検出された報告がない。しかし全身疾患を有するような易感染者に対して感染リスクが高くなることやスタンダードプレコーションの概念を考えれば、より安全を期するために歯科ユニット

からの配水の微生物の多いことに対して認識を高め定期的な検査や微生物を減少させるための処置を考えていく必要がある。

結論

平成16年度に確立した歯科医院内デンタルユニット内循環水の微生物を検出同定する方法を用いて、実際に検討を行うと一部のサンプルにおいて従属細菌のみが検出された。今後サンプル採取施設を増やし検討を行う必要があることが示唆された。

今後の検討

- 1) サンプルを全国の協力歯科医院 20 ヶ所から採取する。(6, 7月)
- 2) サンプルを国立感染症研究所に輸送し、菌の同定を行う。(7~9月)
- 3) 結果をまとめる。(10, 11月)

研究成果発表

Senpuku H, Tada A, Uehara S, Kariyama R, Kumon H. Post-operative infection by pathogenic microorganisms in the oral cavity of patients with prostatic carcinoma. Journal International Medical Research. in press.

表1 スリーウェイシリンジ、タービン、水道から水の微生物の定量および同定

| 施設 | デンタルユニット の製造年月 | 採水部位 | 一般細菌 | 従属細菌 (20°C) | 従属細菌 (42°C) | 大腸菌 | 黄色ブドウ球菌 | 抗酸菌 | 原虫 | シジオネラ |
|----|-------------------|------------|------|-------------|-------------|-----|---------|-----|----|-------|
| | | | | | | | | | | |
| A | 昭和63年7月 | スリーウェイシリンジ | — | 0 | 0 | — | — | — | — | — |
| | | タービン | — | 34080/ml | 0 | — | — | — | — | — |
| | | 水道水 | — | 1740/ml | 0 | — | — | — | — | — |
| B | 平成4年5月 | スリーウェイシリンジ | — | 0 | 0 | — | — | — | — | — |
| | | タービン | — | 0 | 0 | — | — | — | — | — |
| | | 水道水 | — | 0 | 0 | — | — | — | — | — |
| C | 平成2年4月 | スリーウェイシリンジ | — | 0 | 540/ml | — | — | — | — | — |
| | | タービン | — | 0 | 0 | — | — | — | — | — |
| | | 水道水 | — | 2080/ml | 20/ml | — | — | — | — | — |

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

研究分担者 公文裕巳（岡山大学大学院医歯薬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薬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薬学総合研究科泌尿器病態学 講師）
上原慎也（岡山大学大学院医歯薬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薬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、抗バイオフィルム剤の探索を行う必要があり、バイオフィルム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・治療法を確立するためには、基礎的・臨床的問題点を把握することも重要である。一方、デンタルユニットや歯科ウォーターラインなどの歯科医療環境における細菌バイオフィルムに対しても抗バイオフィルム剤を開発することができれば、院内感染防止に寄与することとなる。

本年度は、キャピラリーフローセルを用いたバイオフィルム実験モデル系において、緑膿菌性バイオフィルムに対する抗菌薬の有効性評価を行い、新たな知見を得た。また、抗バイオフィルム剤のスクリーニング法として、ペグ付き 96 穴マイクロプレートを用いたバイオフィルムアッセイ法を新たに導入した。本スクリーニング法により大腸菌性バイオフィルムに対するクランベリー代謝関連化合物の評価を行った結果、抑制効果を発揮する化合物を数種類見出した。

以上の新規バイオフィルム実験法は、抗バイオフィルム剤開発のための新しい実験・評価系として有用であり、歯科医療における細菌バイオフィルム関連の問題点を解決するための基盤技術として、院内感染防止システムの開発に応用できる。

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。昨今、歯科ウォーターラインにおいても細菌バイオフィルムの存在が確認されており、院内感染防止対策上の問題点として指摘されている。従って、歯科医療における院内感染防止システムの開発において、抗バイオフィルム剤の

開発は重要な研究課題である。有効性の高い多種多様の抗バイオフィルム剤を開発することができれば、口腔内バイオフィルムの予防や治療に有用であるばかりでなく、歯科医療環境におけるバイオフィルム形成に対しても抑制効果を発揮することが期待できる。しかし、世界中の多くの研究者らによる懸命の探索にもかかわらず、今もって、“magic bullet”と

しての抗バイオフィルム剤は存在しない。

我々は本年度の研究目的として、昨年度までに確立したバイオフィルム実験モデル系であるキャピラリーフローセルシステムを用いた検討を継続するとともに、大腸菌性バイオフィルムに対するクランベリー代謝関連化合物の抑制効果を評価することを目的として、スクリーニング法の確立を目指した。クランベリーは尿路感染症の予防に役立つばかりでなく、口腔内のバイオフィルム形成に対しても抑制効果を示すことが報告されている。我々はクランベリー本体に存在している成分よりもむしろ単離・精製した代謝物が効果を発揮するという観点から探索研究を遂行している。

B. 研究方法

① *Pseudomonas aeruginosa* OP14-210 および GFP (green fluorescent protein) 産生 OP14-210 (pMF230) 株を用いた。人工尿における浮遊菌に対するレボフロキサシン (LVFX)、ホスホマイシン (FOM)、アジスロマイシン (AZM) の MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) は、それぞれ 8、64、 >2048 であった。ガラスキャピラリー中に菌株を接種して、人工尿を 20 ml/h の流速で灌流し、バイオフィルムを形成させた。使用した薬剤濃度は LVFX 10 x MIC、FOM 3 x MIC、AZM 2, 8, 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、薬剤無添加と薬剤作用後のバイオフィルムを共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。GFP 非産生株が形成したバイオフィルムは、蛍光染色キットを用いて生菌と死菌を染め分けた。

② 大腸菌性バイオフィルムに対するクランベリー代謝関連化合物の抑制効果を評価するために、微量 (mg 単位) 成分も評価することができるペグ付き 96 穴マ

イクロプレートを用いて、バイオフィルムの形成能を定量化した。

C. 研究結果

① GFP 産生株に接種直後から薬剤を作用させて 3 日後に観察すると、FOM 単独では疎なバイオフィルムを形成するものの、LVFX 単独・LVFX・FOM 併用ではバイオフィルムの形成を認めなかった。AZM 単独の場合は薬剤無添加の場合と同様、いずれの薬剤濃度においても均一かつ密なバイオフィルムを形成した。GFP 産生株が 1 日後に形成したバイオフィルムに 72 時間薬剤を作用させると、LVFX 単独・FOM 単独では明らかな効果を認めなかったが、併用効果としてのバイオフィルムの解離を認めた。GFP 非産生株が 2 日後に形成したバイオフィルムに 18 時間薬剤を作用させると、LVFX 単独では死菌が浅層部で多く観察された。FOM 単独では生菌の分布が薬剤無添加と同程度に確認された。LVFX と FOM 併用では深層部まで死菌が観察され、併用効果が認められた。

② 現在までに、19 種類のクランベリー代謝関連化合物について、大腸菌性バイオフィルムに対する抑制効果を評価した。その結果、vanillic acid, homovanillic acid, 4-coumaric acid, ferulic acid, isoferulic acid が抑制効果を示すことを確認した。

D. 考察

① 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。

② バイオフィルムアッセイ法として、今年度から導入したペグ付き 96 穴マイクロプレートは、単離・精製された微量

成分のスクリーニング法として有用である。

③クランベリー代謝関連化合物が大腸菌性バイオフィームに対して抑制効果を発揮することが明らかとなり、それらの代謝物は口腔バイオフィームに対しても抑制効果を持つ可能性がある。

E. 結論

生体の細菌バイオフィームは医学・歯学各科領域の枠を超えて総合的に理解されるべき病態であり、バイオフィーム感染症に対する予防法・治療法の確立は重要な研究課題である。また、歯科医療における院内感染防止対策において、デンタルユニットや歯科ウォーターラインなどの環境における細菌バイオフィームに対しても抗バイオフィーム剤の開発を行う必要がある。

新しいバイオフィーム実験モデル系の開発と抗バイオフィーム剤の探索を継続することは細菌バイオフィームが関与する院内感染を防止する上で重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 59(3): 79-87, 2005.
- 2) Mikuniya, T., Kato, Y., Kariyama, R., Monden, K., Hikida, M., Kumon, H. : Synergistic effect of fosfomycin and fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Acta Medica Okayama* 59(5): 209-216, 2005.

- 3) Senpuku, H., Tada, A., Uehara, S., Kariyama, R., Kumon, H. : Post-operative infection of pathogenic microorganism in oral cavity of patients with prostatic carcinoma. *The Journal of International Medical Research* 34(1): 95-102, 2006.

- 4) 狩山玲子、三國谷 雄、加藤佳久、疋田宗生、門田晃一、公文裕巳：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。第 39 回緑膿菌感染症研究会講演記録 p.95-99, 2005.

- 5) 狩山玲子、瀬野祐子、光畑律子、門田晃一、公文裕巳：腸球菌性尿路バイオフィーム形成に関する検討。 *Bacterial Adherence & Biofilm* 19: 60-65, 2005.

2. 学会発表

- 1) 第 79 回日本感染症学会総会 名古屋 2005, 4. 14-15
「尿路感染症由来 *Enterococcus faecalis* のバイオフィーム形成能に関する検討」
狩山玲子、瀬野祐子、門田晃一、公文裕巳
- 2) The XVth International Symposium on Gnotobiology : Tokyo, Japan 2005, 6.20-24
「Synergy between levofloxacin and fosfomycin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in a capillary biofilm system」
Kariyama, R., Mitsuhashi, R., Uehara, S., Monden, K., Kato, J., Kumon, H.
- 3) 第 19 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 : 小倉 2005, 7.

1-2

「腸球菌性尿路バイオフィルム形成に関する検討」

狩山玲子、瀬野祐子、光畑律子、門田晃一、公文裕巳

- 4) 第 22 回中国地区インフェクションフォーラム : 岡山 2005, 7. 23

「緑膿菌性バイオフィルム尿路感染症の臨床的・基礎的検討」

上原慎也、光畑律子、村尾 航、石井 亜矢乃、狩山玲子、門田晃一、公文裕巳

- 5) 第 16 回 尿路感染症研究会 東京 2005, 10. 22

「新しい *in vitro* biofilm 実験モデル系(キャピラリーフローセルシステム)での緑膿菌 biofilm に対する抗菌薬の有効性評価」

狩山玲子、光畑律子、和田耕一郎、村尾 航、上原慎也、門田晃一、公文裕巳

- 6) 第 40 回 緑膿菌感染症研究会 新潟 2006, 2. 10-11

「キャピラリーフローセルシステムにおける緑膿菌 biofilm に対する抗菌薬の有効性評価」

狩山玲子、光畑律子、上原慎也、門田晃一、公文裕巳

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

研究分担者 狩山玲子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学 助手）
研究協力者 千田好子（岡山大学医学部保健学科看護学専攻 教授）
野村佳代（岡山大学医学部保健学科看護学専攻 助手）
犬飼昌子（岡山大学医学部保健学科看護学専攻 助手）
光畑律子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学 技術補佐員）

研究要旨

医療依存度の高い入院患者および在宅療養患者の口腔ケアに関する評価システムの構築は、歯科医療における院内感染防止システムを構築する上でも重要な研究課題である。

まずは、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を細菌学的・形態学的に検討した結果、*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* など、易感染患者への感染、つまり日和見感染・院内感染の原因菌である親水性のグラム陰性桿菌が多く分離されていた。

今後、誤嚥性肺炎を発症して入院した在宅療養患者および脳神経系病棟に入院している患者の口腔・唾液の細菌検査ならびに使用頻度の高い吸引（口腔・鼻腔・気管内）カテーテルの細菌汚染状況の実態把握を細菌学的・形態学的に継続することにより、効果的な口腔ケアの確立を目指す。本研究成果は、歯科医療における院内感染防止システムを構築する上での基盤研究となりえる。

A. 研究目的

医療依存度の高い入院患者および在宅療養患者の口腔ケアに関する評価システムの構築は、歯科医療との連携が望まれる重要な研究課題である。

本研究課題では、口腔・唾液の細菌検査のみならず、吸引（口腔・鼻腔・気管内）カテーテルへの付着菌およびバイオフィル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。昨年度に開始した研究協力者との共同研究「人工呼吸回路による長期在宅呼吸管理を必要とする患者の

感染管理システムの構築」において収集された気管内吸引カテーテルを本研究課題での研究対象として、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。今年度後半からは、誤嚥性肺炎を発症して入院した在宅療養患者および脳神経系病棟に入院している患者の口腔ケアの実態調査を行うとともに、口腔・唾液の細菌検査ならびに吸引（口腔・鼻腔・気管内）カテーテルの細菌汚染状況の実態把握にも着手した。以上の実態調査を遂行するとともに口腔ケアの評価を行うことによ