

り、歯科医療における院内感染防止システムの構築を目指す。

B. 研究方法

在宅療養患者 38 名が使用した気管内吸引カテーテル 38 本が収集され、それぞれのカテーテルを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、生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、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

気管切開を受けた在宅療養患者 38 人のうち、人工呼吸器を装着していた患者（装着群）は 14 人であった。人工呼吸器装着群 14 人、非装着群 24 人に使用したカテーテル（1 本/1 人）のうち、それぞれ 6 本、10 本、計 16 本から一般細菌が検出された。同定された菌種のうち、3 本以上から分離された菌種は、*Pseudomonas aeruginosa*、*Burkholderia cepacia*、*Stenotrophomonas maltophilia* であり、それぞれ 5 本、5 本、3 本のカテーテルから分離された。38 本のカテーテルから分離された菌種の 80% 以上はグラム陰性菌であり、人工呼吸器非装着群に使用したカテーテルには、グラム陽性菌も付着していた。カテーテルから検出された生菌数は人工呼吸器非装着群が装着群より有意に多かった。

培地上に菌が検出されたカテーテルでは、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。また、付着物の中に菌が埋もれていて、バイオフィルムが形成されていると考えられるカテーテルもあった。走査型電子顕微鏡で菌が見られなかった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

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。医療依存度の高い入院患者および在宅療養患者に対して、効果的な口腔ケアを確立することにより、歯科医療における院内感染防止システムの構築にも寄与できると考えられた。

病院では気管内吸引は無菌操作で行い、吸引カテーテルは毎回新しい滅菌済みのものに換えて使用することが推奨されている。しかし在宅ケアでは、我々の実態調査でも示されたように、1~5 カ月間同じカテーテルを頻回再使用するケースがあった。本検討において、細菌の培養・同定のみでは、カテーテルへの細菌の付着状況を十分に把握できなかったため、走査型電子顕微鏡での形態学的観察を行った。その結果、付着菌・付着物・バイオフィルム形成菌を判別することが可能であった。カテーテルの肉眼的汚染状況

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た。

E. 結論

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調査に際して、今年度までに確立した基礎技術を用いて細菌学的・形態学的な検討を行うことにより、要介護者に対する効果的な口腔ケアの確立に寄与することができる。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 千田好子、渡邊久美、犬飼昌子、野村佳代、岡野初枝、林 優子、狩山玲子、光畑律子：人工呼吸回路による在宅呼吸管理を必要とする患者の感染管理の実態と気管内吸引関連物品の細菌汚染に関する検討。岡山医学会雑誌（印刷中）
- 2) 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に付着した一般細菌の生菌数測定方法に関する検討。岡山大学医学部保健学科紀要（印刷中）
- 3) 野村佳代、大野勝雄、光畑律子、渡邊久美、犬飼昌子、千田好子、狩山玲子：再使用した気管内吸引カテーテルの走査型電子顕微鏡による観察。INFECTION CONTROL メディカ出版（印刷中）

2. 学会発表

- 1) 第 21 回日本環境感染学会総会：東京 2006, 2. 24-25

「人工呼吸器装着の有無による在宅療養患者に使用した気管内吸引関連物品の細菌汚染の比較検討」

千田好子、渡邊久美、犬飼昌子、野村佳代、岡野初枝、狩山玲子、光畑律子

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

歯周病診療における院内感染の検討

歯周病患者治療時において噴出される血液および歯肉縁下微生物の同定および評価、予防システムの開発

分担研究者 高柴正悟 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
研究協力者 藤本千代^{1, 2)}, 宮川淳子¹⁾, 杉浦裕子¹⁾, 曾我賢彦¹⁾, 前田博史¹⁾
前田知子²⁾, 大谷久美²⁾, 金中章江²⁾
所属 1)岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野
2)医療法人長光会 長島病院 歯科

研究要旨

骨髄移植患者の口腔内の歯周病細菌感染状況を把握した。さらに、このような患者の歯周病医療を含む口腔ケア時における歯周病細菌と薬物耐性遺伝子を有する細菌の飛散状況を調べた。

A. 研究目的

口腔細菌の感染症である歯周病の治療や有病者の口腔由来感染を防止する目的の口腔ケア時において、口腔細菌の感染状況と口腔細菌の周囲への飛散状況を知ることが目的とした。さらに、実験室レベルでの感染モニタシステムの応用を試みた。

B. 研究方法

1. 造血幹細胞移植患者の口腔内細菌の感染状況を、口腔内の臨床所見と合わせて調べた。
 - 1) 細菌の検出には培養法を、総細菌数の検討には 16S rRNA 遺伝子のリアルタイム PCR 法を用いた。
 - 2) 口腔内の感染予防に乾燥防止ゲルを用いて、使用前後での患者の感想や細菌数の変化を調べた。
 - 3) 同ゲルの *in vitro* での抗菌性を、標準的な菌株を用いて調べた。
2. 歯科診療チェア上で口腔ケアを行った際に周囲へ飛散する口腔細菌の状況を調べた。
 - 1) 生菌が飛散しているか、ATP 活性を調べた。
 - 2) 細菌数の検討には、16S rRNA 遺伝子のリアルタイム PCR 法を用いた。
 - 3) 細菌叢の検討には、DGGE 法を用いた。
 - 4) 飛散した細菌にメチシリン耐性に関わる *mecA* が検出されるか、PCR 法で調べた。

3. PCR 法よりも簡便で迅速な等温遺伝子増幅法である LAMP 法を用いた口腔細菌検出方法の普及を試みた。

C. 研究結果

易感染性状態にある造血幹細胞移植患者では、口腔内の細菌叢が変化し、それが口腔乾燥に関連することがわかった。乾燥防止ゲルは、痛みや不快感を軽減するだけでなく、細菌の増殖に抑制的に作用することが示唆された。

口腔ケア時には、相当数の口腔内細菌が生菌のまま周囲に飛散することがわかった。飛び抜けて細菌数が多い場合があるので、塊として飛散することが示唆された。また、飛散した細菌の DGGE 解析像は口腔内のものに類似していた。さらに、*mecA* を有する細菌も検出された。なお、リアルタイム PCR 法によって十分に検出されるが、相当な時間が必要であった。

時間的に有利な細菌検出法である LAMP 法を用いようと試みたが、チェアサイドで用いるためにはキット化と簡易の恒温槽が必要であることがわかった。

D. 考察

口腔内感染の予防や歯周病治療の際に、口腔内細菌叢や数をモニタすることは有用である。現存の培養法やリアルタイム PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅法によるモニタは、ほぼ完成されたと思われる。しかし、これも有

効であるが、より迅速で簡便な方法が求められている。LAMP 法はその解決策の一つになるかもしれない。

E. 結論

口腔内感染の予防や歯周病治療の際に、口腔内細菌叢や数をモニタすることを普及するため、LAMP 法を実施できるように方法を改善する必要がある。

歯科治療後の通常の清掃によって、飛散した細菌を除菌できているか、このモニタ法を応用してみたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

移植期中に口腔粘膜上から検出される細菌種に対する口腔内保湿ジェル(オーラルバランス(R))の抗菌性の検討, 第 28 回日本造血細胞移植学会総会, 2006/2/24.

等温遺伝子増幅法(LAMP 法)による歯周病細菌の検出, 第 48 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2005/9/22.

3. 添付資料

造血幹細胞移植期の口腔感染管理方法に関する研究

口腔ケア時における口腔内細菌の飛散状況

中国地域バイオシーズガイドブック

H. 知的財産件の出願・登録状況

該当なし

造血幹細胞移植期の口腔感染管理方法に関する研究

—唾液代替剤が口腔粘膜上細菌量に及ぼす影響—

杉浦裕子, 曾我賢彦, 前田博史, 高柴正悟
岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野

緒言

造血幹細胞移植とは、すべての血球に分化・増殖し、かつ自己を複製する能力をもつ造血幹細胞を移植する治療法¹⁾である。造血幹細胞移植は様々な疾患に対して行われているが、その治療目的によって大きく2つに分けることができる。1つは、造血系や免疫系に異常をきたす疾患に対して骨髄組織の根本的置換を目的として行われるもので、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、各種免疫不全性疾患に対するものである。もう1つは、白血病や悪性リンパ腫など造血系の悪性腫瘍の治療のために超大量の化学療法や放射線療法を施行した際に造血・免疫系の救済を目的として行われるもので、同種移植の場合にはドナー由来の免疫担当細胞によるがん免疫療法としての側面を併せもっている²⁾。従来は、造血幹細胞自身を同定することが困難なので、造血幹細胞を多く含む骨髄を採取・輸注すること(骨髄移植)が行われてきたが、最近では末梢血あるいは臍帯血も造血幹細胞のソースとして用いること(末梢血幹細胞移植、臍帯血移植)が盛んに行なわれるようになった¹⁾。日本造血細胞移植学会が取りまとめた全国の造血幹細胞移植の件数は、2003年の報告で約2,700件に達している³⁾。

造血幹細胞移植患者は種々の感染症に罹患しやすく、それによる致死率も高いため、移植医療では感染症の予防に対策の重点がおかれている²⁾。移植に際しては大量化学療法や全身放射線照射が行われることが多いため、この副作用として、口腔内の広範な糜爛、すなわち口腔粘膜障害が高頻度に発生する。口腔粘膜障害の重症化は移植後6~12日がピークとなり^{4,5)}、この期は白血球数が極めて少ない易感染期と重なっている。成人における化学療法中の口腔粘膜障害の発症率は40%程度になる⁶⁾。この口腔内病変はグラム陽性菌の菌血症との関連が指摘されている。抗悪性腫瘍剤であるシタラビン(Ara-C)大量療法後に口内炎を来たした患者にはviridans streptococci菌血症が多いという報告⁷⁾や、口腔衛生状態とviridans streptococci菌血症は関連があるという報告⁸⁾がある。移植期の感染管理にあたり、口腔粘膜障害に伴う感染対策は一つの課題である。

臨床的に、口腔粘膜障害が現れる時期の患者から口腔乾燥の訴えを聞くことが多い。化学療法あるいは放射線療法といった唾液腺に障害を与える抗腫瘍治療と口腔乾燥との関わりは、すでに一般的によく知られたものであり、いくつかの総説にまとめられている^{9,10)}。口腔粘膜の保護において、唾液は重要な役割を果たす。唾液は、数多くの生体由来の抗菌性物質を含むとともに、物理的にも口腔内の微生物の排出および歯牙との接触の緩衝作用を有し、口腔内の組織に対して優れた保護作用をもたらす^{11,12)}。したがって、造血幹細胞移植期の口腔乾燥対策は、同期の感染対策として重要かもしれない。

しかし、抗腫瘍治療と口腔乾燥との関わりはすでによく知られたものであるにも関わらず、口腔乾燥を口腔粘膜自体の保湿度から客観的に評価した報告は未だない。これまでの口腔乾燥の評価の多くは、ガムやパラフィンなどの刺激物を使って、唾液腺を刺激する方法が多くとられてきた¹³⁾。主に刺激時の唾液の流出量から評価するものであるが、口腔乾燥は必ずしも唾液分泌の減少と関連づけられるものではない¹⁰⁾。化学療法や放射線療法を伴う造血幹細胞移植は、唾液の量だけでなく質の変化をも引き起こしている⁹⁾。唾液は高い割合で器質的に粘性が増してくる。さらに放射線療法によって、透明から黄色茶褐色へと変化が見られる¹⁴⁾。また、この時期の口腔粘膜自体の性状は、がん治療による影響でしばしば粘膜の表面は剥がれ落ちて、損傷を受けており、通常と異なる状況にある¹⁵⁾。

そこで、本研究では、まず造血幹細胞移植中の患者の口腔粘膜自体の乾燥度を評価することとした。近年、口腔粘膜自体の保湿度を静電容量で測定する機器(口腔水分計・モイスチャーチェ

ツカームーカス[®]、ヨシダ、東京)が開発された¹⁶⁾。口腔粘膜自体の乾燥度を評価する方法としては現在のところこの方法が一番容易なので、同機器を用いて移植期の口腔粘膜の保湿度を調べることにした。

次に、口腔乾燥症の治療に際して用いられている唾液代替剤を用いた口腔乾燥対策が造血幹細胞移植期にも応用できるか検討した。本院では口腔乾燥対策として、頭頸部癌の放射線治療の際に生ずる口腔乾燥症の症状を改善するという報告¹⁷⁾に加えて、保湿効果が長時間持続するジェルタイプの製品であること、本来の唾液に含まれるラクトパーオキシターゼ、リゾチーム、ラクトフェリン等の抗菌物質を含んでいること、そしてラウリル酸硫酸ナトリウムやアルコール成分などの粘膜障害性のある成分が含まれていないという理由から、オーラルバランス[®] (Laclede Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)の使用を推奨している。造血幹細胞移植期には口腔粘膜障害が頻発し、口腔粘膜が損傷を受けている¹⁵⁾ので、使用する唾液代替剤は刺激性を持ったり口腔粘膜痛を増強させたりするものであってはならない。そこで、唾液代替剤の使用と、看護の際の口腔粘膜痛の訴えとの関係を調査した。そのうえで、唾液代替剤の使用が造血幹細胞移植期の口腔感染対策としての効果を、本院で日常的に行っている臨床細菌検査の結果から、さらに検出された口腔粘膜上の細菌種に対する抗菌性を *in vitro* で調べることから検討した。

本研究では、上記のように造血幹細胞移植期の患者に対して行っている日常の臨床成績の調査に加えて、患者の口腔粘膜上から検出される細菌の増殖に及ぼす影響を *in vitro* で調べて、造血幹細胞移植期の口腔感染管理方法として口腔乾燥対策の意義を考察した。

対象および方法

1. 調査対象患者

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うにあたり、同院歯周科に口腔感染管理のため紹介をされた患者 36 名 (男性 22 名, 女性 14 名, 平均年齢 41.6 ± 16.2 歳) を調査対象とした。患者の口腔感染管理のため、歯周組織検査と全顎デンタル X 線診査による歯周・歯肉疾患の有無とその程度が調べられ、口腔感染巣を除去するために、う蝕症、歯内疾患、そして歯周病に対する治療が行われている。さらに造血幹細胞移植期には主にオーラルバランス[®] (Laclede Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) を用いて口腔の保湿を行いながら、口腔の不快感の問診と口腔細菌の量および種類がモニターされている。

なお、日常の口腔管理に関する結果の使用に関して、口頭にてインフォームド・コンセントを得た。

2. 口腔粘膜の保湿度の評価

移植前 7 日から移植後 14 日までの口腔粘膜の保湿度を評価した。

口腔粘膜の保湿度は、口腔水分計・モイスタチャーチェッカームーカス[®] (ヨシダ、東京) を用いて測定した。なお、健常者 62 名 (本院医療従事者: 男性 27 名, 女性 35 名, 平均年齢 43.0 ± 14.6 歳) の口腔粘膜の保湿度も測定して、健常対照とした。

3. 口腔粘膜痛の評価

日常の看護における口腔粘膜痛の訴えの評価に用いられている Wong-Backwer faces pain rating scale¹⁸⁾ のペインスコアを用いて、造血幹細胞移植期の患者群における口腔粘膜痛の程度の推移を調べるとともに、唾液代替剤の使用前後の口腔粘膜痛の変化を調査した。すなわち、図 1 に示すフェーススケールを患者に提示してペインスコアを得た上で、そのスコアの変化を唾液代替品の使用前後で評価した。

4. 造血幹細胞移植期の口腔粘膜上細菌種の同定

口腔粘膜上の細菌種の同定には、移植の始まる前 7 日から移植後 14 日までの間にルーチン検査として 3 回 (1 回目: 移植前 7 日～前日, 2 回目: 移植翌日～7 日, 3 回目: 移植後 8～14 日) 行われている口腔粘膜上の一般細菌好気培養検査の結果を用いた。なお、培養と菌種の同定は、岡山大学医学部・歯学部附属病院中央検査室で行われたものである。

5. 頬粘膜上の総菌数の測定

頬粘膜上の総菌数の測定には、本院特殊歯科総合治療部の第二総合歯科診療室の易感染性患者に対して行われている口腔粘膜上総細菌量の検査結果を用いた。その測定方法の概略は、直径 1 cm の円内の頬粘膜上について滅菌綿棒で細菌サンプルを採取して、Maeda らの方法¹⁹⁾を用いて、16S リボゾーム RNA 遺伝子量をリアルタイム PCR 法にて定量するものである。

なお、健常者 10 名（本院医療従事者：男性 5 名、女性 5 名、平均年齢 30.5±4.2 歳）の頬粘膜上の総細菌数も同じ方法によって測定し、対照とした。

6. 唾液代替品(オーラルバランス®)の抗菌性の検討

前項 4 で同定された造血幹細胞移植期に頻繁に検出される細菌種の標準株を対象に、唾液代替品(オーラルバランス®)の抗菌性を調べた。なお、使用菌株は表 1 に示した。

これらの菌を Mueller-Hinton 培地 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) もしくは Brain Heart Infusion 培地 (Difco Laboratories) を用いて、好気条件下で 37 °C 一昼夜静置培養し、その菌液をマックファーランド 0.5 相当の濁度²⁰⁾になるようにリン酸緩衝生理食塩水 (Invitrogen Corporation, Grand island, NY, USA) で希釈した。希釈菌液を Brain Heart Infusion 寒天培地 (Difco Laboratories) あるいは Sensitivity Disk Agar-N 「ニッスイ」(日水製薬, 東京) 培地に播種し、抗菌テストに用いた。抗菌テストは、播種した寒天培地上に、オーラルバランス®を 0.1 g (実験群) とオーラルバランス®を 90 °C で 30 分加熱したものを 0.1 g (失活させたもの：対照群)、さらに抗菌剤(薬剤感受性試験用ディスク テトラサイクリン 30 µg, もしくはアムホテシリン B 100 µg を浸潤させた濾紙断片) を載せて、同じ培地プレート上の 3 点で抗菌性を比較した。

7. 統計分析

造血幹細胞移植期の患者の口腔粘膜の保湿度と健常者群の統計学的な検定は、Student-*t* 検定を用いて行った。唾液代替品の使用前後の総細菌数の変化に対する統計学的な検定は、ウィルコクソン符号順位検定 (Wilcoxon signed-ranks test) を用いて行った。これらの統計学的解析にあたっては、統計ソフト StatFlex (アーテック, 大阪) を用いた。

結 果

1. 造血幹細胞移植期の口腔粘膜の保湿度

造血幹細胞移植期間中の口腔粘膜の保湿度を、図 2 に示す。移植を受けた患者 (n=36) の乾燥度は、健常対照群 (n=62, 27.3±3.5%) に比べて、常に有意に低い値を示した。

2. 造血幹細胞移植患者の口腔粘膜痛

造血幹細胞移植期の患者群における口腔粘膜痛の程度の推移を図 3 に示す。移植を受けた患者 (n=36) の口腔粘膜痛は、移植後 2 日から強くなる傾向が見られ、移植後 7 日～12 日がピークになった。

3. 唾液代替剤の使用による口腔粘膜痛の変化

唾液代替剤の使用による口腔粘膜痛の変化を、表 2 に示す。唾液代替剤を使用した 18 人の調査患者のうち、9 名のペインスコアが改善し、9 名には変化がなかった。ただし、ペインスコアが悪化した患者はいなかった。

4. 造血幹細胞移植期に口腔粘膜上から同定された細菌種

移植期に患者の口腔粘膜から採取された細菌種を、表3に示す。 α -あるいは γ -*Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., そして *Stomatococcus* spp.などの口腔内常在菌を検出する一方で、非常在菌である *Coagulase-negative Staphylococcus* spp.が46.5%という高頻度で同定された。また、*Candida albicans* が5.6%という比較的高い頻度で検出された。さらに、*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* spp., *Stenotrophomas maltophilia*, *Bacillus* spp., そして *Torulopsis glabrata* が、頻度としては低い検出された。

なお、28人の患者に対して移植期中各3回、計84回の検査が予定されていたが、患者の全身状態の悪化のために計71回の検査となった。

5. 唾液代替剤(オーラルバランス®)の使用前後における頬粘膜上の総菌数の変化

頬粘膜上の総菌数は、唾液代替品の使用前後で図4のように変化した。唾液代替剤を使用した前後において、総菌数の変化に有意な差は見られなかった(ウィルコクソン符号順位検定)。唾液代替剤を使用した移植患者の口腔内総菌数は、健常者で検出された総細菌数のレベルよりも同等以下だった。

6. 唾液代替品(オーラルバランス®)の抗菌性

前項の結果4にある移植期の口腔粘膜上で比較的高頻度に検出された細菌種の標準株(表1)に対して、唾液代替品(オーラルバランス®)の抗菌性を調べた結果を図5に示す。

本研究で使用した唾液代替品は、真菌を除くすべての細菌種に対して抗菌性を示し、阻止円が現れた。*C. albicans* に対しては阻止円はなく、唾液代替剤の塗布部位の下部にもわずかに *C. albicans* の増殖が観察された。

考 察

本研究から得られた結果は、以下の通りである。1) 造血幹細胞移植期中の患者の口腔粘膜の保湿度は、調べた全ての日において健常者に比べ有意に低かった。2) 本研究で用いた唾液代替剤の使用によって、口腔粘膜痛の程度は現状維持したか、軽減した。3) 本研究で用いた唾液代替剤は、移植期中に高頻度に検出される細菌種に対して抗菌性を有していた。4) 本研究で用いた唾液代替剤の使用前後で、頬粘膜上の総細菌数には有意な変化がなかった。唾液代替品を使用した移植患者の総菌数は、健常者のものに比べて常に同等以下だった。

口腔粘膜障害の重症化は移植後6~12日がピークになる^{4,5)}。本研究で調査した造血幹細胞移植患者の口腔粘膜痛の程度は移植後7~12日がピークとなり、口腔粘膜障害の重症化の時期に関する既報とほぼ一致した。そこで、本研究では、移植前の超大量化学療法あるいは全身放射線照射が開始されることが多い移植前7日から、移植後14日までの間を調査期間とした。

患者本人の主観的な感覚や、唾液の流出量ではなく、口腔粘膜自体の保湿度を静電容量として数値化して評価したところ、調査期間の全ての日において、健常者群に比べ有意に口腔粘膜の保湿度は低下していた。このことから、移植期間中の口腔粘膜は乾燥状態にあり、口腔粘膜の保護において唾液が果たす重要な役割を何らかの形で補う必要性がうかがえた。

移植期の唾液代替剤の使用にあたっては、造血幹細胞移植期の患者の白血球数がゼロに近い激しい易感染状態で推移する以上、決して感染を助長するものであってはならない。そこで、移植期中に口腔粘膜上で検出される細菌種を知り、さらに使用する唾液代替剤がそれらに対して抗菌性を持つかを調べた。移植期の口腔粘膜上からは非口腔常在菌も多く検出されたうえ、結果には示さないが、時には抗菌剤感受性検査で多剤に対して極めて高い耐性を有した細菌が検出されることがあり、菌交替現象が起こって日和見感染に関わる細菌が増殖していることが疑われた。得られた細菌検査の結果の中には種名まで明らかにされず、属名までにとどまったものがあつた。そこで、それらについては口腔内で代表的な細菌種の標準菌株を対象として、唾液代替剤が細菌の増殖に及ぼす影響を調べた。すなわち、*Streptococcus* spp.については *S. sanguis* および *S. salivarius* を、*Neisseria* spp.に対しては *N. mucosa* を、*Stomatococcus* spp.については *S. mucilaginosus* を、そして *Coagulase-negative Staphylococcus* spp.については *S. epidermidis* を対象として、唾液代替剤による増殖阻止効果を調べた。その結果、調べた全ての

細菌に対して、本研究で用いている唾液代替剤は阻止円を形成し、抗菌性を示した。陰性対照として用いた加熱した唾液代替品の周囲には阻止円は現れなかったため、本製品に含まれている唾液の構成成分であるリゾチームやラクトペルオキシダーゼなどの酵素が、この唾液代替品の抗菌性を担っていることが推測された。興味深いことに、*S. epidermidis* に対しては、陽性対照としたテトラサイクリンディスクの周囲に阻止円が現れなかったが、本唾液代替品の周囲に阻止円が形成された。移植期には多種の抗菌剤が使用されることが多く、それにより抗菌剤耐性菌が高頻度に出現することを考えれば、本来唾液に含まれる酵素の非特異的な抗菌性を口腔粘膜の感染管理に利用することは合理的であるかもしれない。

本研究結果で得られた移植期中に口腔粘膜上から検出される細菌の中には、すでに易感染患者における敗血症との関わりが報告されているものがある。*Streptococcus* spp.²¹⁾あるいは*Stomatococcus* spp.^{22,23)}と白血球減少患者における敗血症との関わりが指摘されている。また、移植期中に検出される Coagulase-negative *Staphylococcus* は、しばしば強い抗菌剤に対する耐性を有し、日和見感染に関与する。Coagulase-negative *Staphylococcus* は、移植期中の原因不明の発熱の際の血液培養から最も高頻度で検出されるとの報告がある²⁴⁾。免疫抑制の状態にある患者の Coagulase-negative *Staphylococcus* などの菌血症の侵入門戸として、口腔粘膜は一つの重要な経路になり得るとする見解もある²⁵⁾。本研究で用いたような、本来の唾液に含まれる酵素で抗菌性を有し、抗菌剤耐性菌の発生を助長せず、粘膜障害性のある成分を含まない条件を具備する唾液代替剤を用いた積極的な口腔衛生管理は、造血幹細胞移植期の口腔感染管理に役立つ可能性がある。

また、移植期には *C. albicans* や *T. glabrata* といった真菌も検出された。白血病（骨髄異形成症候群を含む）など造血器疾患に特に高い頻度で見られる内臓真菌症は、予後不良な感染症の一つである²⁶⁾。造血幹細胞移植患者は液性ならびに細胞性免疫能がかなり低下しており、真菌症発症のハイリスク患者である。免疫能の低下とともに、血小板減少患者では出血などによる消化管粘膜のバリアーの破綻を招き、真菌のうち特に *Candida* などによる全身播種の感染巣となる²⁵⁾。口腔粘膜上の *Candida* の量が多く、口腔粘膜障害によって粘膜のバリアーが破壊された際は、口腔も深在性真菌症の原因となり得る。本研究で用いた唾液代替剤の *C. albicans* に対する抗菌テストの結果は、加熱処理した陰性対照と著明な違いはなく、唾液代替剤に含まれる唾液由来酵素の抗菌性は期待できるものではない。しかし、唾液代替剤およびその陰性対照ともに塗布自体で増殖は抑制されており、少なくとも *C. albicans* の増殖を助長するものではない。

本研究で使用した唾液代替剤の使用前後における頬粘膜上の総細菌数は有意な差がないという結果を得た。抗菌テストから得た結果からすれば使用後に減少することが期待されるが、この結果は唾液代替剤という特性を考えれば納得のいくものである。すなわち、抗菌テストから得られた結果から明らかに本唾液代替剤は移植期中の口腔粘膜上の細菌に対して抗菌性を持つが、その抗菌力は唾液に準じるものであり、口腔乾燥を有さない健常者の総菌数程度までしか総菌数は減らないのであろう。本研究結果で注目すべきは全ての造血幹細胞移植期の調査患者において、その口腔粘膜上の総菌数が健常者のその域を超えることがなかったということである。本研究を臨床介入研究として設定しなかったため、唾液代替剤を用いなかった患者の検査結果がない。そのため、今回行った口腔感染管理を実施していない場合での造血幹細胞移植患者の口腔内細菌の状況は、文献上で知り得るのみである。今後は、両方の場合を設定した介入研究が必要である。そうすれば、上記の考察に裏付けが得られると期待される。

本研究では唾液代替剤の影響を主に細菌学的な面から捉えたが、本剤の使用により口腔粘膜痛の悪化はなく、実際に唾液代替剤を使用した患者からは、口腔粘膜障害で糜爛を呈する粘膜と歯などの接触痛が和らいだという感想をよく聞いた。唾液の役割は物理的にも口腔内の微生物の排出および歯牙との接触の緩衝作用を有し、口腔内の組織に対して優れた保護作用をもたらす^{11,12)}ことからすれば、あるいは疼痛管理、そして粘膜と歯などの物理的な接触を防ぐことにより口腔粘膜障害の増悪防止にも、唾液代替剤は貢献している可能性がある。

本研究で用いた唾液代替剤による口腔内管理を行うにあたって起こった問題が一つあった。それは内科的治療の進行により味覚障害が生じ、本唾液代替剤の味を受けつけなくなった患者が一部見られた。本唾液代替剤にはキシリトールで甘味を付けてある。この味に耐えられなくなった患者を見た。本研究では、医薬部外品として入手可能であるオーラルバランス[®]を使用して行ったが、上述の条件を満たす唾液代替剤であれば何でも使用可能である。あるいは他の味を有する唾液代替剤も味覚障害等の変化に応じて使用しながら、口腔乾燥によって失われて

いる唾液を補うといった対策も考慮する必要がある。さらに、歯科衛生士や看護師の日常業務として、あるいはそれらの指導の下で患者やその家族によって実施可能であるシンプルな口腔感染管理が、造血幹細胞移植期の口腔内感染管理として有効な一つの方法であると考えた。

結 論

造血幹細胞移植期の口腔乾燥を口腔粘膜自体の保湿度から客観的に評価するとともに、市販の唾液代替剤が造血幹細胞移植中の患者の口腔粘膜上から検出される細菌種に及ぼす抗菌性と口腔粘膜上の細菌量に及ぼす影響を調べた。その結果、造血幹細胞移植中の患者の口腔粘膜の保湿度は有意に低下しており、本研究で用いた唾液代替剤が移植中に口腔粘膜上から検出される細菌に対してわずかながら抗菌性を示し、その使用により粘膜上の総細菌数は健常者で検出された総細菌数のレベルよりも同等以下だった。これらの結果から、唾液代替剤の使用は造血幹細胞移植期の口腔内感染管理として有効な一つの方法であることを示唆した。

文 献

- 1) 岡本真一郎:造血幹細胞移植;内科学(黒川清,松澤佑次編).第1版,文光堂,東京,1404-1407,1999.
- 2) 高橋聡:造血幹細胞移植療法;血液内科学(浅野茂隆編).第1版,中外医学社,東京,109-119,1999.
- 3) 日本造血細胞移植学会全国データ集計事務局:平成16年度全国調査報告書;, <http://www.jshct.com/>, 2005.
- 4) Schubert, M.M., Peterson, D.E. and Lloid, M.E.: Oral Complications; in *Hematopoietic Cell Transplantations* (Thomas, E.D., Blume, K.G. and Forman, S.J., editors). 2nd, ed. Blackwell Science Inc., Malden, MA, 751-763, 1999.
- 5) Sonis, S.T.: Oral Complications; in *Cancer Medicine* (Bast, R.C., Kufe, D.W., and Pollock, R.E., editors): 5th, ed. B.C. Decker Inc., Hamilton, ON, 2371-2379, 2000.
- 6) Berger, A.M. and Kilroy, T.J.: Oral complications; in *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (DeVita, V.T., Hellman, S and Rosenberg, S.A., editors): Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 2714-2725, 1997.
- 7) Kern, W., Kurrle, E. and Schmeiser, T.: Streptococcal bacteremia in adult patients with leukemia undergoing aggressive chemotherapy. A review of 55 cases. *Infection*, 18, 138-145, 1990.
- 8) Graber, C.J., de Almeida, K.N., Atkinson, J.C., Javaheri, D., Fukuda, C.D., Gill, V.J., Barrett, A.J. and Bennett, J.E.: Dental health and viridans streptococcal bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.*, 27, 537-542, 2001.
- 9) Jensen, S.B., Pedersen, A.M., Reibel, J. and Nauntofte, B.: Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support. Care Cancer*, 11, 207-225, 2003.
- 10) Amerongen, A.V. and Veerman, E.C.: Current therapies for xerostomia and salivary gland hypofunction associated with cancer therapies. *Support. Care Cancer*, 11, 226-231, 2003.
- 11) Brandtzaeg, P.: Salivary immunoglobulins; in *Human saliva: clinical chemistry and microbiology* (Tenovuo, J. editor): vol. II. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1-54, 1989.
- 12) Tenovuo, J.: Antimicrobial function of human saliva - how important is it for oral health? *Acta Odontol. Scand.*, 56, 250-256, 1998.
- 13) Enberg, N., Alho, H., Loimaranta, V. and Lenander-Lumikari, M.: Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 92, 292-298, 2001.
- 14) Frank, R.M., Herdly, J. and Philippe, E.: Acquired dental defects and salivary gland lesions after irradiation for carcinoma. *J. Am. Dent. Assoc.*, 70, 868-883, 1965.
- 15) Filicko, J., Lazarus, H.M. and Flomenberg, N.: Mucosal injury in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: new approaches to prophylaxis and treatment. *Bone Marrow Transplant.*, 31, 1-10, 2003.
- 16) 柿木保明:口腔乾燥症に対する新たな診断機器と検査方法に関する検討.厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究事業「高齢者の口腔乾燥症と唾液物性に関する研究」平成13年度報告書, 31-34, 2002.
- 17) Warde, P., Kroll, B., O'Sullivan, B., Aslanidis, J., Tew-George, E., Waldron, J., Maxymiw, W., Liu, F.F., Payne, D. and Cummings, B.: A phase II study of Biotene in the treatment of postradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. *Support. Care Cancer*, 8, 203-208, 2000.
- 18) Wong, D.L. and Baker, C.M.: Pain in children: comparison of assessment scales. *Pediatr. Nurs.*, 14,

9-17, 1988.

- 19) Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeyuchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F. and Takashiba, S.: Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **39**, 81-86, 2003.
- 20) Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493-496, 1966.
- 21) Richard, P., Amador Del Valle G, Moreau, P., Milpied, N., Felice, M.P., Daeschler, T., Harousseau, J.L. and Richet, H.: Viridans streptococcal bacteraemia in patients with neutropenia. *Lancet*, **345**, 1607-1609, 1995.
- 22) Gruson, D., Hilbert, G., Pigneux, A., Vargas, F., Guisset, O., Texier, J., Boiron, J.M., Reiffers, J., Gbikpi-Benissan, G. and Cardinaud, J.P.: Severe infection caused by *Stomatococcus mucilaginosus* in a neutropenic patient: case report and review of the literature. *Hematol. Cell Ther.*, **40**, 167-169, 1998.
- 23) Fanourgiakis, P., Georgala, A., Vekemans, M., Daneau, D., Heymans, C. and Aoun, M.: Bacteremia due to *Stomatococcus mucilaginosus* in neutropenic patients in the setting of a cancer institute. *Clin. Microbiol. Infect.*, **9**, 1068-1072, 2003.
- 24) Kloos, W.E. and Bannerman, T.L.: Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol.*, **7**, 117-140, 1994.
- 25) Kennedy, H.F., Morrison, D., Kaufmann, M.E., Jackson, M.S., Bagg, J., Gibson, B.E., Gemmell, C.G. and Michie, J.R.: Origins of *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus oralis* causing bacteraemia in a bone marrow transplant patient. *J. Med. Microbiol.*, **49**, 367-370, 2000.
- 26) 久米光:真菌症の診断;血液疾患合併感染症(正岡徹編). 最新医学社, 大阪, 75-84, 2002.

表1. 抗菌テストに使用した菌種および菌株

菌種	菌株
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC10556
<i>Streptococcus salivarius</i>	JCM5705
<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC19695
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	JCM10910
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBRC12993
<i>Staphylococcus aureus</i>	FDA209
<i>Candida albicans</i>	NBRC1385

表2. 唾液代替剤使用後のペインスコアの変化

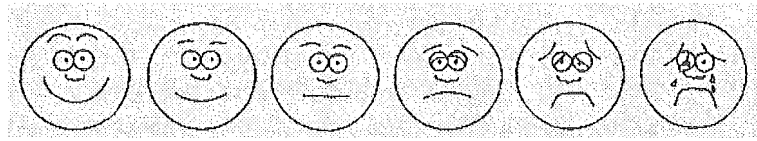
ペインスコアの変化	人数(名 / 18名)
改善した	9
変化なし	9
悪化した	0

対象患者18名について行った唾液代替剤使用後における口腔粘膜痛の変化の調査結果を示す。ペインスコアは、Wongらの方法を基準とした(図1参照)。

表3. 患者の口腔内から検出された主な細菌種

菌種		同定頻度 (%)	同定回数 (回 / 71回)
口腔内常在菌	<i>α-Streptococcus</i> spp.	87.3	62
	<i>γ-Streptococcus</i> spp.	29.6	21
	<i>Neisseria</i> spp.	43.7	31
	<i>Stomatococcus</i> spp.	23.9	17
口腔内非常在菌	Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp.	46.5	33
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.8	2
	<i>Haemophilus influenzae</i>	1.4	1
	<i>Enterococcus</i> spp.	1.4	1
	<i>Stenotrophomas maltophilia</i>	1.4	1
	<i>Bacillus</i> spp.	1.4	1
真菌	<i>Candida albicans</i>	5.6	4
	<i>Torulopsis glabrata</i>	1.4	1

対象としたのべ患者28名について、口腔粘膜上に検出された細菌種の同定試験を計71回行った結果を示す。



ペインスコア: 0 1 2 3 4 5

図1. 本研究で使用した痛みの評価基準

Wong-Backwer faces pain rating scaleのペインスコアを使用した。
 0: 痛みがまったくない; 1: わずかに痛みがある; 2: 軽度の痛みがあり, 少し辛い; 3: 中等度の痛みがあり, 辛い; 4: かなりの痛みがあり, とても辛い; 5: 強い痛みがあり, とても耐えられない

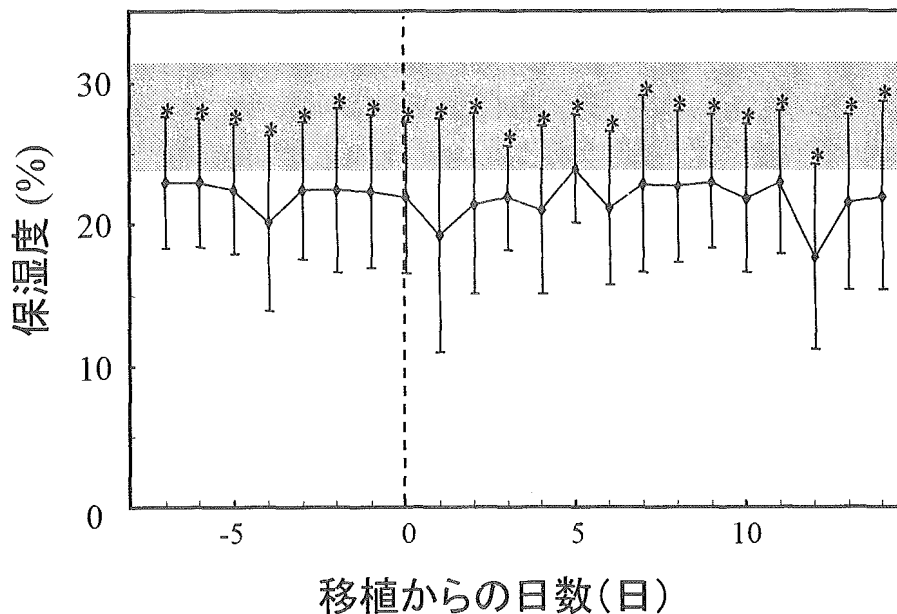


図2. 造血幹細胞移植期の患者の口腔粘膜の保湿度の推移

対象とした患者数は36名。グラフは, “対象および方法”の項に記載した方法を用いて, 患者群の口腔粘膜の保湿度の平均±標準偏差の推移を示す。有意差はStudent-t検定を用いて, 健常対象(N=62)の口腔粘膜の保湿度(27.3 ± 3.5%)と比較して判定した。なお, 図のグレーゾーンは, 健常対象の口腔粘膜の保湿度の平均±標準偏差の領域を示す。*: $p < 0.05$ 。

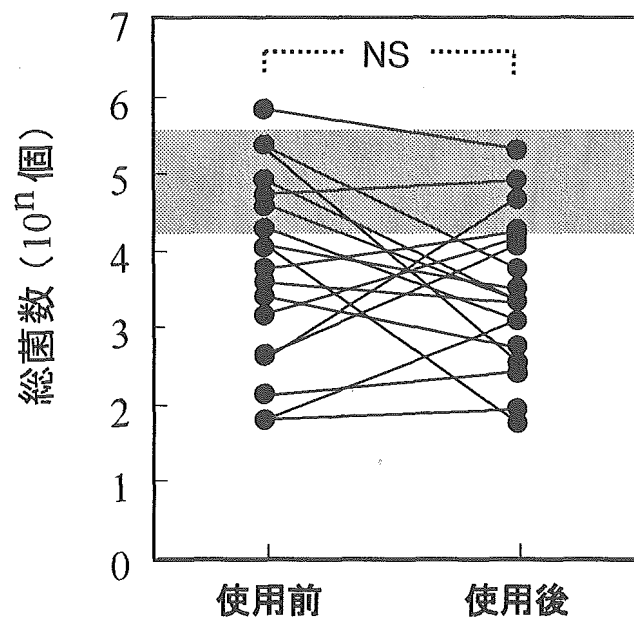


図4. 唾液代替剤(オーラルバランス®)の使用前後における頬粘膜上の総菌数の変化

対象患者(18名)の唾液代替剤(オーラルバランス®)の使用前後における頬粘膜上の総菌数の変化。ウィルコクソン符号順位検定を用いて使用前後の総菌数の有意差を検定した。なお、図のグレーゾーンは健常者(N=10)の頬粘膜上から検出された総菌数の領域を示す。NS:有意差なし。

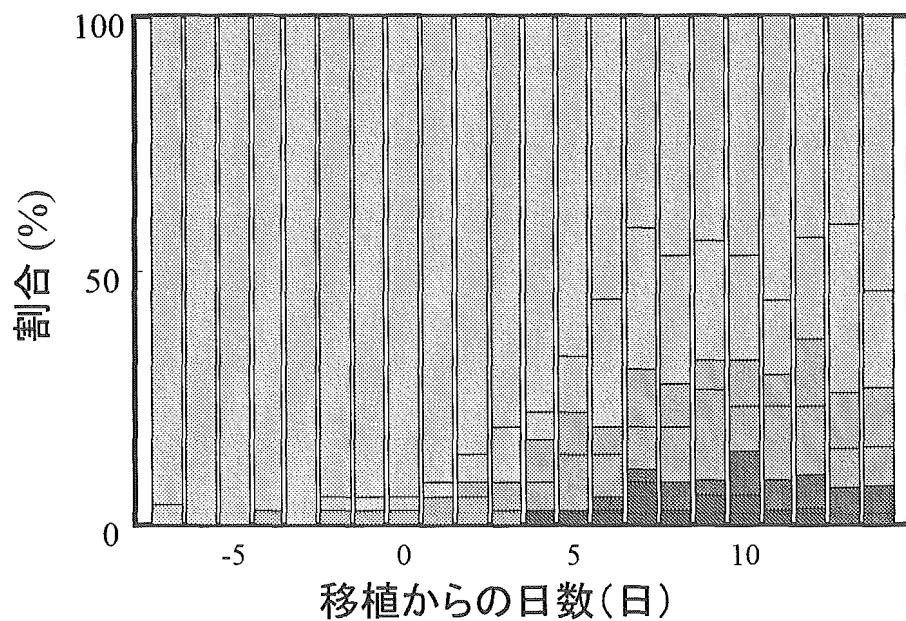


図3. 造血幹細胞移植患者の口腔粘膜痛の推移

対象とした患者数は36名。グラフは、Wongらのペインスコアを基準として、造血幹細胞移植期の患者群における口腔粘膜痛の程度の推移を示す。□：スコア 0, 痛みがまったくない；▤：スコア 1, わずかに痛みがある；▥：スコア 2, 軽度の痛みがあり, 少し辛い；▦：スコア 3, 中等度の痛みがあり, 辛い；▧：スコア 4, かなりの痛みがあり, とても辛い；▨：スコア 5, 強い痛みがあり, とても耐えられない

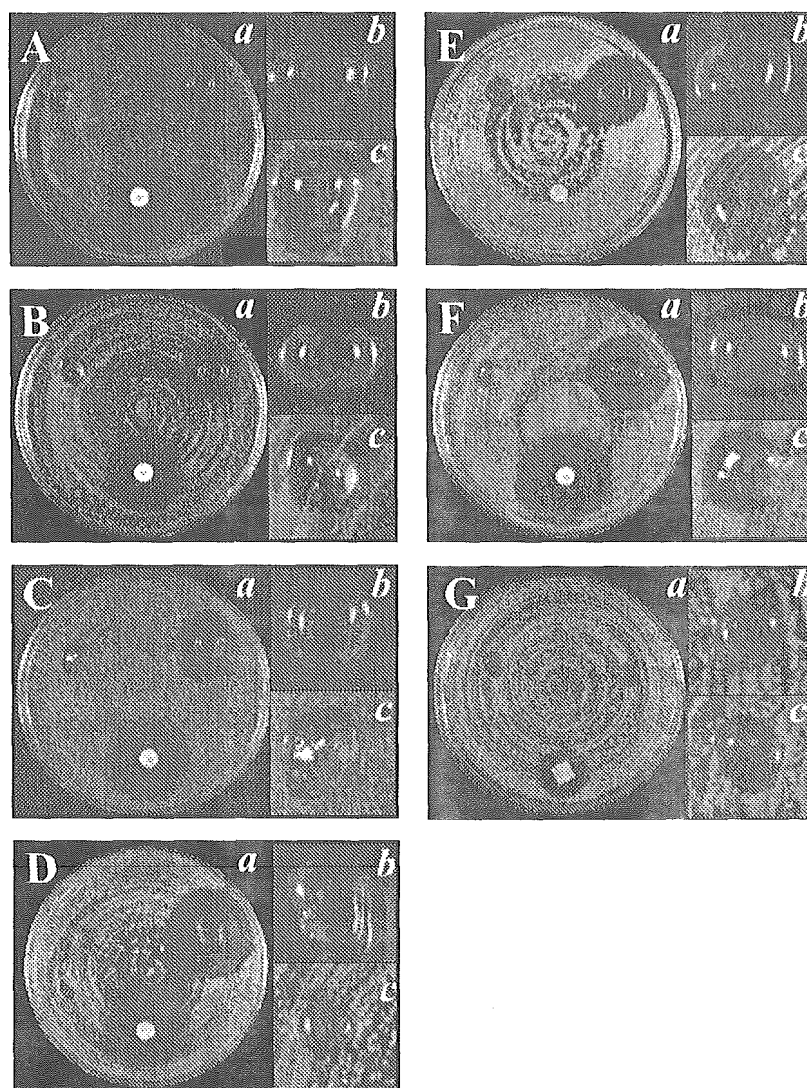


図5. 唾液代替剤(オーラルバランス®)の抗菌性の検討

A~G: 唾液代替剤の増殖阻止効果を調べた細菌や真菌。 A, *Streptococcus sanguis* ATCC10556; B, *Streptococcus salivarius* JCM5705; C, *Neisseria mucosa* ATCC19695; D, *Stomatococcus mucilaginosus* JCM10910; E, *Staphylococcus epidermidis* NBRC12993; F, *Staphylococcus aureus* FDA209; G, *Candida albicans* NBRC1385。

a: “対象および方法”の項に記載した方法を用いて行った細菌や真菌の増殖阻止円。上部左側は、煮沸して抗菌性を失活させた唾液代替剤オーラルバランス®。上部右側は、唾液代替剤オーラルバランス®。下部は、陽性対照。b: 唾液代替剤オーラルバランス®による阻止円の拡大写真。c: 煮沸して抗菌性を失活させた唾液代替剤オーラルバランス®による阻止円の拡大写真。なお、実験の陽性対照として、A-Fには薬剤感受性試験用ディスクテトラサイクリンを用い、Gにはメロニダゾールを用いた。

Chugoku Technology Promotion Center

中国地域 バイオシーズガイドブック



2006年2月

財団法人 中国技術振興センター

Chugoku Technology Promotion Center

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～



高柴正悟先生から一言

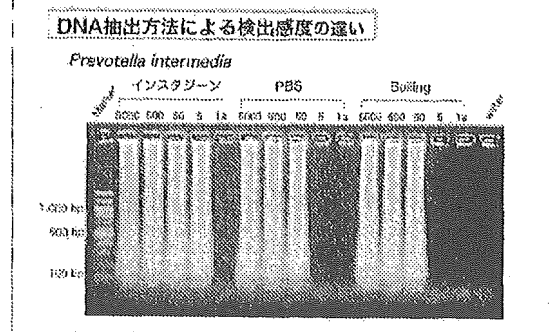
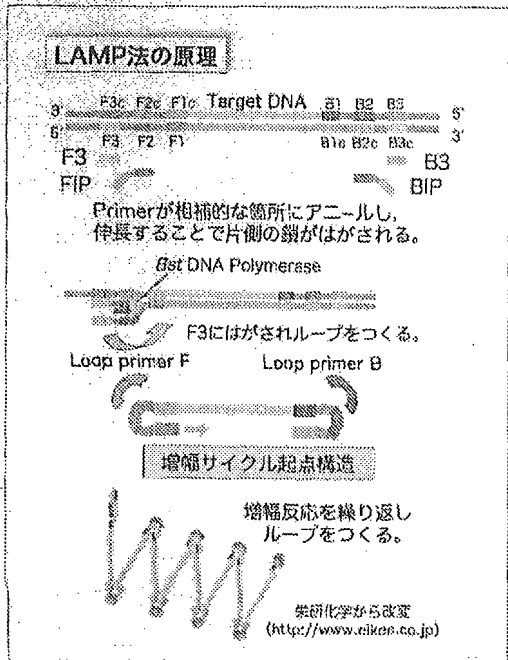
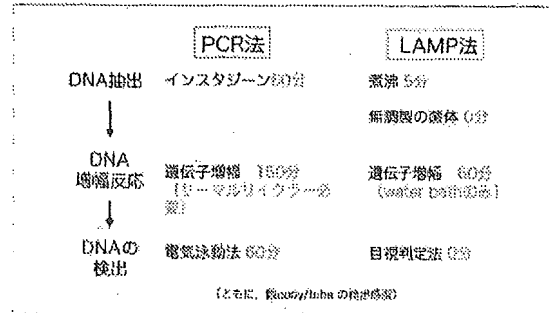
高齢化が進む日本において、目・耳・口の機能は生活の質を保つために大切です。口の中の細菌感染は、むし歯や歯周病を起こすだけでなく、全身へも影響を与えます。さらに、身体が弱くなると多剤耐性菌などの日和見感染も問題となります。このような方々のお口の介護に、細菌の迅速検出を役立てたいと思います。

シース概要

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ます。定量検出に用いる機器の開発はこれからの課題ですが、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(介護時間中)で半定量的に検出できます。

シース解説

栄研化学㈱によって開発された LAMP 法を応用して、細菌からの DNA 抽出を行わずに特定の細菌(歯周病細菌群)を半定量的に検出することが可能でした(結果:右図)。これまでの PCR 法に比べて、安価な保温槽を用いて、1/4 以下の短時間(約1時間)で、細菌検出を行うことができました。特定の DNA 配列がポイントです。これを工夫すれば、様々な DNA をターゲットにした増幅が可能で



【用語解説】

LAMP法: loop-mediated isothermal amplification
DNAの両端が折れ曲がったように「ループ」をつくらせてDNAが長く増幅される。一定温度で反応が進むので、装置が簡単です。

PCR法: polymerase chain reaction
変性、アニール、伸長の3段階が独立するため、それぞれに対応した温度設定を行う。温度をそれぞれ変化させる必要があり、装置は複雑になります。