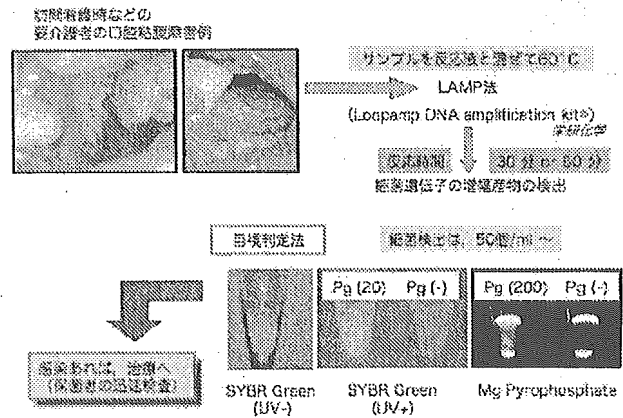


# シーズ応用例

①口腔内細菌の測定・管理:現在の応用を右図に示します。訪問看護時などに要介護者の口の粘膜が荒れている場合、何らかの細菌感染症があることが多く、他の要介護者や介護する者への感染を未然に防ぐことが望まれます。さらに、難治性の感染症であれば、早期に治療することが望まれます。そこで、唾液をサンプルとして直接用いて、特異細菌(MRSAなど)のDNA増幅を行うLAMP反応を行い、介護時間内に直接目で確認できるように結果判定します。ここでは装置として歯科の印象用寒天作製用の携帯型保温槽(60℃)を流用しています。



②訪問介護専用の携帯型装置:上記の検査を介護の現場に持ち出すために現在一番必要なのは、小型の保温槽(60℃前後を30~60分保つ)と濁度測定装置を一体化したハンディーな装置です。濁度測定装置は、DNA量(感染度)を3段階くらいのシグナルで示すことを考えています。さらに、検体のサンプリングからLAMP法測定を1本のチューブで行えるサンプルチューブがあれば便利です。このような装置・デバイスを開発する共同研究先を求めています。

③食品産業、畜産産業への応用:本シーズは、ターゲットのDNAを変えると、様々な感染症(細菌だけでなくウイルスも)をスクリーニングすることができます。この携帯型装置は、食品産業や畜産産業にも有用です。

## 【用語解説】

**MRSA:**メチリン(抗生物質の名称)に耐性を獲得した黄色ブドウ球菌。耐性遺伝子はファージを介したプラスミド(ミニプラスミド)上の耐性遺伝子や由来不明の転移性遺伝子mec(メック)Aで伝搬されます。院内感染の主要なもので、鼻腔などに常在菌として、あるいは一時的に定着し、飛散して、乾燥状態で1か月近く生存します。

**SYBR Green:**核酸を検出するための感度の高い発色用試薬。254 nmトランスイルミネーターを用いた場合で20 pg以下、300 nmの標準トランスイルミネーターを用いた場合でも60 pgの二本鎖DNAの検出が可能です。

**Mg Pyrophosphate:**DNA増幅過程において、副産物として産生されます。増幅されたDNA量に対応しており、透過光で白濁して見えるようになります。

## 知的所有権情報

○特開 2000-83676 「歯周病菌ギンギバリス菌の組換え外膜蛋白質、それをコードする遺伝子及び検出用プライマー」

## 共同研究先

○なし

## お問い合わせ先

機 関 名 : 岡山大学 部 署 名 : 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野  
 役 職・氏 名 : 教授 高柴 正悟  
 住 所 : 〒700-8525 岡山県岡山市鹿田町2-5-1  
 T E L : 086-235-6677 F A X : 086-235-6679 E-mail : stakashi@cc.okayama-u.ac.jp

**財団法人 中国技術振興センター**  
— 地域の産学官コーディネーター —

〒730-0041 広島市中区小町4-33 (中電ビル2号館)  
TEL 082-249-6720 FAX 082-249-2770  
URL <http://www.gr.energia.co.jp/ctpc/>  
E-mail [zfskanri@pnet.gr.energia.co.jp](mailto:zfskanri@pnet.gr.energia.co.jp)

この報告書についてのお問い合わせがございましたら、  
「財団法人 中国技術振興センター 技術開発部」まで  
お寄せください。

## 口腔ケア時における口腔内細菌の飛散状況

前田知子<sup>1)</sup>，大谷久美<sup>1)</sup>，金中章江<sup>1)</sup>，藤本千代<sup>1,2)</sup>  
宮川淳子<sup>2)</sup>，前田博史<sup>2)</sup>，高柴正悟<sup>2)</sup>

1) 医療法人長光会 長島病院 歯科

2) 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野

### はじめに

近年，口腔内のバイオフィルムや慢性炎症は全身疾患の病態に関わっているということが，徐々に解明されている。このことに伴い，さまざまな全身疾患を有する患者をかかえる病院や介護施設において，患者が有する全身疾患への悪影響や誤嚥性肺炎を防止するためと栄養支援チーム（NST）の活動の一環として，口腔ケアを盛んに実施するようになってきている。

口腔内の細菌は，歯面，歯肉溝，唾液，舌，頬や咽頭粘膜に細菌塊（バイオフィルム）となって定着し，固有の細菌叢を形成している<sup>1)</sup>。口腔バイオフィルムを形成性する細菌には，齶蝕や歯周病の発症に関与するグラム陽性連鎖球菌やグラム陰性桿菌の他に，肺炎桿菌，肺炎球菌，黄色ブドウ球菌，緑膿菌，セラチア菌および真菌などの日和見菌も関与している<sup>2)</sup>。特に，日常生活動作が低下し口腔衛生状態の悪化した高齢者や宿主の細菌感染に対する抵抗力が低下した易感染状態の者においては，これらの日和見菌が検出される場合が多い<sup>3,4)</sup>。口腔バイオフィルム細菌や血液を含む唾液が口腔外へ飛散すれば，様々な器具を介して他者へ感染する可能性がある。

口腔ケアを含む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ことである。しかしながら，その監視システムはまだ整備されていないとはいえない。本研究では，歯科医療における院内感染を防止するために，要介護高齢者に対する口腔ケア時の口腔内細菌の飛散状況を調査する。

### 材料および方法

#### 1. 口腔内細菌の採取

要介護高齢者 15 名の上顎前歯および下顎左右臼歯の計 3 部位の全周から，滅菌スケーラーを用いて縁上および縁下細菌を採取した。採取したサンプルは，直ちにリン酸緩衝生理食塩水（GibcoBRL, Grand Island, NY, USA）液 1ml 中に攪拌した。サンプリングに際し被験者には，個人のサンプルの情報は研究のみに用い，他の用途には使用しないこと，協力を断ることで治療上の不利益を被ることはないこと，および研究の内容を被験患者に対して十分に説明して理解と同意を得た。

#### 2. 口腔ケア後の患者周囲に飛散した細菌の採取

0.002%グルコン酸クロルヘキシジン(CHX)含有含嗽剤で 30 秒間含嗽後 10 分間ブラッシングした者 5 名，水で 30 秒間含嗽後 10 分間ブラッシングした者 5 名，および含嗽なしで 10 分間ブラッシングした者 5 名の，被験患者の胸部，肩から左右 90 cm の箇所，術者の眼部，および術者の胸部の計 5 カ所のそれぞれ面積 10 cm<sup>2</sup> から 10 秒間滅菌綿棒にてスワブして採取した。採取したサンプルは，直ちにリン酸緩衝生理食塩水（GibcoBRL）液 1ml 中に攪拌した。

#### 3. 患者周囲の汚染状況の検査

アデノシン 3 リン酸（ATP）とルシフェラーゼの化学反応による発光量を測定する ATP ふきとり検査キット（キッコーマン）を用いて，上記 2 の被験箇所での汚染状況を調べた。

#### 4. 歯周病細菌およびメチシリン耐性遺伝子の検出

上記 1 および 2 で採取したサンプルをから，InstaGene Matrix（Bio-Rad）を用いて，付属の使用説明書にしたがって DNA 抽出を行った。

抽出した DNA から，Maeda ら<sup>5)</sup>および村上ら<sup>6)</sup>の記載に準じて，Polymerase chain reaction (PCR)法を用いて，歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* の 16S ribosomal RNA 遺伝子 (16SrDNA)，メチシリン耐性遺伝子 *mecA*，および総細菌の 16SrDNA の検出を行った（表 1）。

#### 5. 変性濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法による細菌叢の解析

抽出した DNA から、GC クランプ付きユニバーサルプライマー(表 2)を用いた PCR によって 16SrDNA を増幅した。増幅した DNA は、Fujimoto<sup>7)</sup>らおよび石井ら<sup>8)</sup>の記載に準じて DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratory) を用いて、20-50%の変性濃度勾配ポリアクリルアミドゲル中で塩基配列特異的に分離した。

## 結果および考察

生物のエネルギー源である ATP をターゲットとして、口腔ケア後の汚染状況を調べた(表 3)。ATP ふきとり検査キット(キッコーマン)は、食品製造機器類の清浄度管理に用いられているもので、高い清浄度レベルは 200 以下とされている。患者の胸部、術者の眼部、および術者の胸部は、汚染の程度が大きかった。しかしながら、CHX 含嗽、水含嗽、および含嗽なし群間の汚染状況に差はみられなかった。また、すべての被験箇所において ATP を確認したことから生菌が存在する可能性も示唆された。

被験者の口腔内および口腔外の被験箇所から採取したサンプルから、歯周病細菌とメチシリン耐性遺伝子を検出した(表 4)。*mec A* を口腔内に保有している被験者において、含嗽の有無にかかわらず口腔外の被験箇所から *mec A* は検出されなかった(表 4)。*P. gingivalis* および *P. intermedia* は、口腔外の被験箇所からも検出された。そしてその割合は、水含嗽および含嗽なしの被験者群に比べて CHX 含嗽群の方が低い傾向にあった。さらに、歯周病細菌を検出した口腔外の被験箇所は、CHX 含嗽群の場合は被験者の胸部からだけであったが、水含嗽および含嗽なしの場合は、それ以外の箇所からも検出された。また、すべてのサンプルから総細菌の 16SrDNA の増幅がみられた(以上、結果は示していない)。

口腔内および口腔外のサンプルの細菌叢を、複雑な細菌複合体の全体像を可視化できる DGGE で調べた(図 1)。口腔内のサンプルの泳動パターンと口腔外のサンプルの泳動パターンがほぼ同様であることから、口腔外のサンプルの細菌叢は、口腔内由来であることを確認した。

歯科治療は、抜歯や歯周外科などの観血的処置に限らず、タービンや超音波スケーラーを用いた通常の際の際にも、血液が混入した唾液、口腔内細菌および切削粉塵などからなるエアゾルや飛沫が発生する。そして、患者の口腔からのエアゾル化された分泌物は、空気中に拡散すれば感染源となる可能性がある<sup>9)</sup>。そのため、エアゾルの飛散や口腔内細菌の飛沫を防止するために口腔外バキュームやパーテーションの設置や、医療従事者への汚染の防止はもちろんのこと医療従事者からの交差感染を防止するためにマスクだけでなくゴーグルとエプロン着用が好ましいとされている。しかしながら、病室、介護施設、および在宅などの歯科診療室以外で行われることが多い口腔ケア時においては、そのような配慮はされていないことが多い。本実験において、超音波スケーラーやタービンなどを用いないブラッシングによる口腔ケア後、術者の胸部や患者の左右 90cm の箇所において口腔内細菌の飛散を確認した。人の出入りのある病室や施設でのケアの場合、医療従事者だけでなく、付き添いおよび面会者や、ベッドや車いすの表面への汚染の恐れも否定できない。

処置前の抗菌剤による口腔洗浄は、患者から発生するエアゾルや飛沫中の口腔細菌数を減少させることができ、医療従事者や診療室の器具類の表面の汚染の可能性を低くすることができる。そしてさらに、観血的歯科治療の際に患者の血液に侵入する細菌数を減少させることも可能である<sup>10,11)</sup>。本実験の ATP を指標とした汚染状況検査では、抗菌剤含嗽群とその他の群とに差はみられなかった。これは、被験者の日常生活動作レベルの違いによるものかもしれない。

日常生活動作の低下により口腔衛生状態が悪化している高齢者や、宿主の抵抗力低下のため易感染状態にある患者の口腔内には、黄色ブドウ球菌や緑膿菌などの院内感染の原因菌が存在することが多い<sup>3,4)</sup>。そして今後は、ますますこのような高齢者や入院患者を対象にした歯科医療を行う機会が多くなると予測できる。歯科処置による周囲の汚染状況検査や院内感染の原因菌となりうる細菌のモニタリングなどは、院内感染防止のために重要と考える。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、貴重な御助言と御指導を頂きました医療法人長光会長島病院の野田綾子看護部長に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C and Kent RL Jr: Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin Periodont*, **25**, 134-144, 1998.
2. Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N: Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology*, **49**, 301-309, 2003.
3. 三宅裕一郎 : 菌の付着に関する最近の問題点(感染症の発症と対策), 口腔粘膜, Today's Therapy '95, **19**, 5-8, 1995.
4. Abe S, Ishikawa K, Okuda K: Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care. *Arch Gerontol Geriatr*, **32**, 45-55, 2001.
5. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, 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.
6. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S: Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **29**, 2240-2244, 1991.
7. Fujimoto C, Maeda H, Kokeguchi S, Takashiba S, Nishimura F, Arai H, Fukui K, Murayama Y: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgingival plaque. *J Periodontal Res*, **38**, 440-445, 2002.
8. 石井浩介, 中川達功, 福井 学: 微生物生態学への変性濃度勾配ゲル電気泳動法の応用. *Microbes and Environments*, **15**, 59-73, 2000.
9. Schaal KP: Medical and microbiological problems arising from airborne infection in hospitals. *J Hosp Infet*, **18**(suppl A), 451-459, 1991.
10. Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P, Gewitz MH, Shulman ST, Nouri S, Newburger JW, Hutto C, Pallasch TJ, Gage TW, Levison ME, Peter G, Zuccaro G Jr: Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *JAMA*, **277**, 1794-1801, 1997.
11. Pallasch TJ, Slots J: Antibiotic prophylaxis and the medically compromised patient. *Periodontol 2000*, **10**, 107-138, 1996.

表

表 1 プライマー (PCR)

標的	塩基配列
Pg	F : 5'-cttgacttcagtggcgagcag-3' R : 5'-agggagacggtttcacca-3'
Pi	F : 5'-aatacccgatgtgtccaca-3' R : 5'-ttagccggctctattcgaa-3'
総細菌	F : 5'-gtgStgcaYggYtgtcgta-3' R : 5'-acgtcRtccMcaccttctc-3'
<i>mec A</i>	F : 5'-aaaatcgatggtaaaggttggc-3' R : 5'-agttctgcagtaccggatttc-3'

S: G/C, Y: C/T, R: A/C, M: A/C

Pg : *P. gingivalis*, Pi : *P. intermedia*, *mec A* : メチシリン耐性遺伝子

表 2 プライマー (PCR-DGGE)

オリゴヌクレオチド プライマー	塩基配列	配列位置 <sup>a</sup>
GC-341F	5'-GC クランプ <sup>b</sup> -cctacgggagcagcag-3'	341-357
907R	5'-ccgtcaattccttt(a/g)agttt-3'	907-926

a : 大腸菌の 16SrRNA 塩基配列部位に相当

b : GC クランプ cgcccgcgcgcccgcgccgtcccgcgccccgcgccc

表 3 汚染状況

subject	breast	r. wall	l. wall	DH face	DH breast
X1	52	30	142	177	375
X2	539	115	68	88	375
X3	14,742	96	204	54	35
X4	178	404	367	190	175
X5	14	44	121	65	34
H1	342	295	221	41	154
H2	1,226	552	655	34	121
H3	316,595	3,989	441	53	45
H4	25,730	266	102	35	1,602
H5	2,583	65	228	150	20
N1	4,040	13	16	37	61
N2	11,170	19	37	910	823
N3	65,049	74	9	798	179
N4	10,943	47	42	3,627	7,477
N5	984	111	51	37	1,083

(単位：RLU)

X1~5: CHX 含嗽剤で含嗽, H1~5: 水で含嗽, N1~5: 含嗽なし

breast: 患者の胸部, r.wall: 患者の肩から右に90cmのところ,

l.wall: 患者の肩から左に90cmのところ, DH face: 術者の眼部, DH breast: 術者の胸部

RLU: Relative Light Unit

表 4 歯周病細菌およびメチシリン耐性遺伝子の検出状況

subject	Pg (口腔外/口腔内)	Pi (口腔外/口腔内)	<i>mec A</i> (口腔外/口腔内)
X1	-/+	-/+	-/-
X2	-/-	-/-	-/-
X3	+/+	-/-	-/-
X4	+/+	-/-	-/+
X5	-/+	-/+	-/-
H1	+/+	-/+	-/+
H2	-/+	-/-	-/+
H3	+/+	+/+	-/-
H4	+/+	+/+	-/-
H5	+/+	+/+	-/-
N1	+/+	-/-	-/-
N2	+/+	-/-	-/-
N3	+/+	+/+	-/-
N4	+/+	-/-	-/+
N5	+/+	+/+	-/-

Pg: *P. gingivalis*, Pi: *P. intermedia*, *mec A*: メチシリン耐性遺伝子

X1~5: CHX 含嗽剤で含嗽, H1~5: 水で含嗽, N1~5: 含嗽なし



図

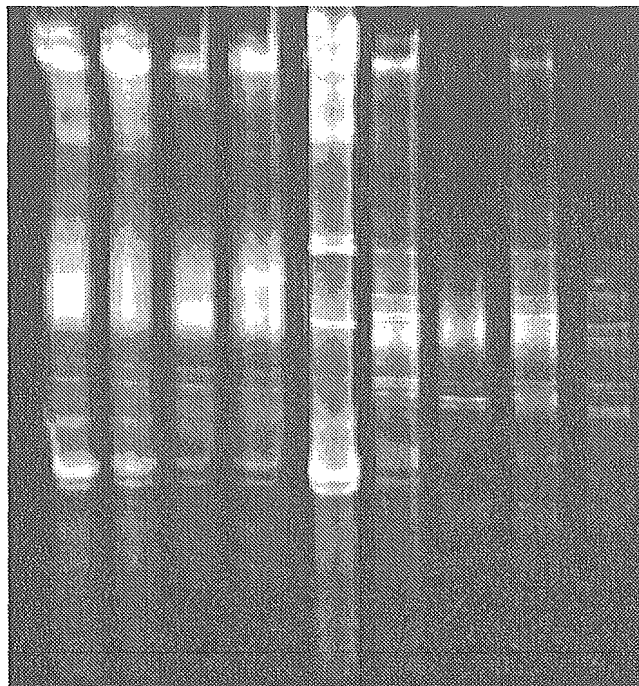


図 1 サンプルから増幅した 16SrDNA の DGGE 像  
1 : H3 mouth, 2 : H3 breast, 3 : H3 r. wall,  
4 : H3 l. wall, 5 : X4 mouth, 6 : X4 breast,  
7 : X4 r. wall, 8 : X4 DH face, 9 : X4 l. wall

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薬学総合研究科 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薬学総合研究科 歯周病態学分野、口腔微生物学分野）

研究要旨

社会構造の変化に伴って歯科を受診する高齢者の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の、歯科診療室における院内感染リスクに関する詳細については不明な点が多い。そこでその実態を明らかにする一端として歯科診療中に手袋のまま触れる可能性の高いデンタルユニット 2箇所（チェア—作動ボタン、無影灯把持部）から日和見菌の検出を試みた。その結果、40名中 2名の患者診察後、作動ボタンからカンジダ菌を検出した。すなわち高齢患者の歯科治療によって院内感染が惹起される可能性が示唆された。

A. 研究目的

社会構造の変化に伴って歯科受診者に占める高齢者の割合が増加している。一般に高齢者は免疫能が低下し、日和見感染症を容易に生じやすいと考えられている。したがって、日常の歯科臨床の場においても、いかに日和見菌による院内感染リスクを軽減することができるかが重要な課題となる。歯科臨床の場において最も院内感染を生じやすい状況は、いわゆる清潔域と不潔域の区別がつきにくい境界領域に存在する器具や装置を不潔な手袋で触れることによって、日和見菌が患者から患者へと伝播することであろう。すなわち、口腔内を触れた手袋で無意識のうちに装置や器具を触り、そのまま次の診療を行うことで院内感染を惹起させることにある。そこで、最も術者が口腔内を触れた手で触ることの多い場所としてチェア—作動ボタンと無影灯の把持部を選択し、これらの部位から歯科診療後に日和見菌の検出を試

みるとともに、アルコール綿による清拭後再度日和見菌の検出を試み、簡易消毒の効果を検討した。

B. 材料と方法

岡山大学病院歯周科受診患者 40名（男性 18名、女性 22名、年齢 41 - 83歳、平均 66.3 ± 9.2歳）を対象として、歯科診療後直ちにチェア—駆動ボタンと無影灯把持部からスワブを用い接触部位を数回拭い、付着菌をサンプリングした。サンプルは直ちにビー・エム・エル社（東京）へ送付し、同社製日和見感染検出キット（培養法）を用いて日和見菌の検出を試みた。サンプリング後、同部位をアルコール綿で十分に清拭した後に同様の操作を行い、アルコール綿清拭による効果を検討した。

C. 経過と考察

歯科治療後、チェア—駆動ボタンから採取し

た 40 サンプルのうち 2 サンプルからカンジダ属の菌を検出した。無影灯把持部から、日和見菌は検出されなかった。アルコール綿による清拭後はいずれの部位からも日和見菌は検出されなかった。

今回、40 例中 2 例の歯科治療後、チェア一駆動ボタンからカンジダ属の菌を培養法によって検出した。カンジダ菌が検出された 2 例はいずれも 2 型糖尿病患者であり、糖尿病患者は一般に易感染性宿主と捉えられていることから、日和見菌の保有菌量が多いものと考えられた。また、2 例中 1 例は義歯使用者であり、義歯表面でカンジダ菌が増殖していた可能性が考えられた。カンジダ属の菌は市中肺炎 (Community-acquired pneumonia) の起炎菌とは考えられていないものの、院内肺炎 (Hospital-acquired pneumonia : 「入院後 48 時間以上を経てから発症した肺炎であり、入院時すでに感染していた者を除いた肺炎」と定義されている) の起炎菌、すなわち日和見感染菌となり得ることが報告されている。したがって、高齢者や入院患者を診療する機会の多い、病院歯科では特に注意を払う必要がある。

また、アルコール綿による清拭後は菌が全く検出されなかったことから、いかなる状況においても清潔域と不潔域の区別が困難な境界領域の患者毎の清拭は必須と考えられた。

#### D. 結論

高齢者に対する歯科診療の機会の多い状況下では、口腔内の日和見感染菌が容易に患者から患者へと伝播する可能性が示唆された。今回、検出した *Candida* sp. は市中肺炎の原因とは考えられていないものの院内肺炎の病巣から分離されていることが報告されており、高齢者の多い診察室ではとりわけ患者毎のアルコール清拭が必須と考えられた。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究発表

1. Mineshiba J, Myokai F, Mineshiba F, Matsuura K, Nishimura F, Takashiba S. Transcriptional regulation of beta-defensin-2 by lipopolysaccharide in cultured human cervical carcinoma (HeLa) cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 45:37-44, 2005.
2. Oyaizu K, Mineshiba F, Mineshiba J, Takaya H, Nishimura F, Tanimoto I, Arai H, Takashiba S. Periodontal treatment in severe aplastic anemia. *J Periodontol*, 76:1211-1216, 2005.
3. Oyama M, Myokai F, Ohira T, Shiomi N, Yamashiro K, Arai H, Nishimura F, Takashiba S. Isolation and expression of FIP-2 in wounded pulp of the rat. *J Dent Res*, 84:842-847, 2005.
4. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol*, 76:2075-2084, 2005.
5. Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. Periodontal host responses with diabetes. *Periodontology 2000*, in press, 2006.

#### 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 苔口 進 岡山大学大学院医歯学総合研究科 助教授  
研究協力者 前田博史、宮川淳子、西村英紀、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

研究要旨

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法に代わる新しい遺伝子増幅法 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて主要な歯周病細菌の検出法を確立した。LAMP 法はサーマルサイクラーなどの特別な機器を必要とせず、目視判定が可能なことや反応時間が短いことからチェアサイドでの歯科臨床細菌検査に有効に活用できる。また、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 法は栄研化学株式会社によって近年開発された簡易で迅速かつ高感度な新しい遺伝子増幅法である。この LAMP 法を用いて主要な歯周病細菌検出法を確立し、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*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Tannerella forsythia*、*Eikenella corrodens*、*Fusobacterium nucleatum*、*Prevotella intermedia*、*Treponema denticola* などの主要な歯周病細菌の標準株を用いた。
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：それぞれの歯周病細菌 16S rRNA 遺伝子の菌種特異領域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

LAMP 法に用いる鋳型 DNA は、未処理の菌体そのまま (PBS 懸濁液) あるいは InstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いての抽出したものあるいは菌体を boil (100°C、5 分間) して調製したものを比較した。検出感度は InstaGene Matrix を用いて調整した DNA を鋳型とした場合が最も高く (1~10 細胞/反応液)、その他 2 種類の調整方法での感度は InstaGene Matrix に比べて 2~10 倍低い結果となったが、簡便化した方法でも臨床検査には応用可能であった。供試した *P. gingivalis* を含め 7 菌種すべてから、設計したプライマーを用いた 60 分の等温反応によって、16S rRNA 遺伝子を特異的に効率よく増幅することができた。

D. 考察

LAMP 法は PCR 法と同様にあるいはそれ以上に感度も特異性も高く、さらに定温で反応が行なえ、簡便であることから歯周病細菌だけでなく他の病原細菌検出法の開発が期待できる。

E. 結論

LAMP 法はサーマルサイクラーなどの特別な機器を必要とせず、目視判定が可能なことや反応時間が短いことからチェアサイドでの歯科臨床細菌検査に有効に活用できる。今後、この LAMP 法を適用して薬剤耐性菌

である MRSA や日和見感染症の原因菌の検出法の開発に繋がりたい。

F. 健康危険情報  
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

苔口 進、前田博史. 口腔微生物フローラと保健. Food & Food Ingredients Journal vol. 210, No. 4, p. 348-p. 360, 2005.

2. 学会発表

日本歯科保存学会 2005 年春季学会 (第 122 回) 日本歯科保存学雑誌 第 48 巻 春季特別号 p. 125 平成 17 年 6 月.

日本歯周病学会 2005 年秋季学術大会 (第 48 回) 日本歯周病学会会誌 第 47 巻 秋季特別号 p. 152 平成 17 年 8 月.

日本環境感染学会 学術集会 (第 21 回) 環境感染 第 21 巻 Supplement p. 212 平成 18 年 1 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

歯学部学生や歯科衛生士学校生に対する院内感染防止対策に関する意識調査について

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  
研究協力者 佐藤 法仁、渡辺朱理 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
口腔微生物学分野

研究要旨

歯学部学生に対して病原微生物（HBV、HCV、HIV、結核、MRSA など）や院内感染防止対策に関する教育やその習熟度合いさらに意識や関心などに関して基礎的なアンケート調査を行なった。その結果、歯学部 1、2 年生さらには歯科臨床実習中の歯学部 6 年生も微生物学や感染防御などの専門知識と技術の修得に高い関心のあることが認められた。卒後、院内感染に対する意識の向上を持続させていくためにも感染防御に関する専門教育や ICD などの専門医制度などの周知を学部学生期から行なえる教育カリキュラムや体制の充実が重要である。

A. 研究目的

これから歯学部臨床実習の現場で臨床教育を受けて、歯科医療従事者となる歯学部学生や歯科衛生士学校生に対して病原微生物（HBV、HCV、HIV、結核、MRSA など）や院内感染防止対策に関する教育やその習熟度合い、意識や関心などが今後の歯科医療における感染防止対策を図る上で重要と思われる。

歯学部学生および歯科衛生士学校生を対象に微生物学や院内感染防止対策に関する知識や意識についてアンケート調査を行ない、関心度などを評価し、院内感染防止対策に繋げる。

B. 研究方法

1. 対象者：歯学部 1、2 年生 111 名（平均年齢 19.5 歳）および歯科臨床実習中の歯学部 6 年生 56 名（平均年齢 25.3 歳）。
2. アンケート調査：歯学部 1、2 年生に対しては微生物学に対する意識調査 [微生物学の分野で学びたい領域、感染制御医師 (Infection Control Doctor: ICD) への関心など] また歯学部 6 年生に対しては感染制御医師 (ICD) に関する意識調査をそれぞれアンケート用紙による質問で行ない、無記名方式で実施した。

C. 研究結果

1. 歯学部 1、2 年生のうち 89 名 (80.2%) が口腔微生物学に特に関心があり、「口腔微生物と全疾患の関係」が現在もっとも学びたい領域 (37.7%) であった。また感染制御医師に対しては 89 名 (80.2%) の学生が関心のあることがわかった。
2. 歯科臨床実習中の歯学部 6 年生のうち 38 名 (67.9%) が ICD に関心があった。臨床歯系学など専門分野に関心のある学生は多かったが、その中でも 22 名 (39.3%) が実際に ICD の資格を取得したいと回答していた。

D. 考察

歯科医療従事者は診療中に唾液、血液に暴露され、多くの病原微生物 (HBV、HCV、HIV、結核、MRSA など) の感染のリスクに直面する。今回のアンケート調査を実施することによって病原微生物や院内感染防止対策などに対する歯学部学生個人個人の意識を喚起することができたようだ。

歯学部 1、2 年生さらには歯科臨床実習中の歯学部 6 年生も微生物学や感染防御などの専門知識と技術の修得に高い関心があるようだ。

感染防御に関する専門教育や ICD などの専門医制度などの周知を学部学生期か

ら行なえる教育カリキュラムや体制の充  
実が重要であろう。

#### E. 結論

歯学部学生に対して微生物学や院内感  
染防止対策に関する意識調査を行ない、  
病原微生物や感染防御方策さらには専門  
医である ICD 制度についても関心度が高  
いことがわかった。

さらに個々の病原微生物(HBV、HCV、HIV、  
結核、MRSA など)に関してアンケートに  
よる意識調査を続けて実践的な感染防御  
教育の充実に繋げたい。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

佐藤法仁、苔口 進、福井一博. 歯学部  
1、2年生における口腔微生物学に関する  
意識調査. 医学と生物学、第149巻、第12  
号、p.444-448、2005.

佐藤法仁、苔口 進、福井一博. 歯学部  
臨床実習生における「感染制御医師」に対  
する意識調査. 医学と生物学、第149巻、  
第12号、p.483-486、2005.

佐藤法仁、高橋佳代、渡辺朱理、苔口 進、  
福井一博. 感染防止と歯科医療受診行動  
Ⅰ ～歯科学学生、歯科衛生士学生、非医療  
系大学生における歯科医院選択に対する  
意識調査～. 医学と生物学、第150巻、第  
4号、印刷中、2006.

佐藤法仁、渡辺朱理、苔口 進、福井一博.  
感染防止と歯科医療受診行動 Ⅱ ～歯  
科学学生、歯科衛生士学生、非医療系大  
学生における歯科医院選択におけるHIV/AIDS  
に対する意識調査～. 医学と生物学、第150  
巻、第6号、印刷中、2006.

##### 2. 学会発表

歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会  
(第47回) Journal of Oral Biosciences  
Volume 47 p.125 Supplement September

2005.

日本環境感染学会 学術集会(第21回)  
環境感染 第21巻 Supplement p.  
212 平成18年1月.

#### H. 知的財産件の出願・登録状況

該当なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 別紙 5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小森康雄	感染対策の実際	小森康雄	感染対策実践ガイドライン	デンタルダイヤモンド	東京	2005	24-98
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	小森康雄	感染対策実践ガイドライン	デンタルダイヤモンド	東京	2005	102-105
泉福英信	歯科医療において重要な感染症の疫学と院内院内感染対策調査	小森康雄	感染対策実践ガイドライン	デンタルダイヤモンド	東京	2005	130-136

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	34 巻 1 号	95-102	2005
Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H	Clinical implications of biofilm formation by <i>Enterococcus faecalis</i> in the urinary tract.	Acta Medica Okayama	59 巻 3 号	79-87	2005
Mikuniya, T., Kato, Y., Kariyama, R., Monden, K., Hikida, M., Kumon, H.	Synergistic effect of fosfomycin and fluoroquinolones against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> growing in a biofilm.	Acta Medica Okayama	59 巻 5 号	209-216	2005
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		95-99	2005
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
Mineshiba J, Myokai F, Mineshiba F, Matsuyama K, Nishimura F, Takashiba S	Transcriptional regulation of beta-defensin-2 by lipopolysaccharide in cultured human cervical carcinoma (HeLa) cells.	FEMS Immunol Med Microbiol	45	37-44	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oyaizu K, Mineshiba F, Mineshiba J, Takaya Nishimura F, Tanimoto I, Arai H, Takashiba S	Periodontal treatment in severe aplastic anemia.	J Periodontology	76	1211-121	2005
Oyama M, Myokai F, Ohira T, Shiomi N, Yamashiro K, Arai H Nishimura F, Takashiba S	Isolation and expression of FIP-2 in wounded pulp of the rat.	J Dent Res	84	842-847	2005
Genco RJ, Grossi SG Ho A, Nishimura F, Murayama Y	A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections.	J Periodontology	76	2075-2084	2005
佐藤法仁、苔口 進、福井一博	歯学部1、2年生における口腔微生物学に関する意識調査	医学と生物学	149巻 12号	444-448	2005
佐藤法仁、苔口 進福井一博	歯学部臨床実習生における「感染制御医師」に対する意識調査	医学と生物学	149巻 12号	483-486	2005
苔口 進、前田博史	口腔微生物フローラと保健	Food & Food Ingredients Journal	210巻 4号	348-360	2005

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 歯科臨床における滅菌・消毒の実際

### 歯科用器材の滅菌・消毒法

# ①洗浄法

洗浄という簡単な作業としてとかく軽視されがちな過程であるが、機械、器具上に残存する汚染物質は滅菌消毒という操作をより困難にし、その効果をなくしてしまうこともある。また、作業手順の不注意により、院内感染等の重大な事故につながる危険性もはらんでいる。洗浄の重要性を正しく認識し、滅菌処理を必要とするすべての器材は、滅菌前に効果的な洗浄を行うことが大切である。

以下に標準的な洗浄のステップを示す。

①仕分け、②洗浄、③すすぎ、④乾燥、メンテナンス、組み立て

#### 仕分け

材質による分類——チタン、ステンレス、ガラス、ゴム製品などの分類を行い、器具ごとに適した洗浄処理法を行う。ハンドピースなど分解が必要な機械は、分解を行う。

#### 洗浄

人手による洗浄か、超音波洗浄機、ウォッシャーディスインフェクターなどの各種洗浄装置を用いて行う。ウォッシャーディスインフェクターの場合は、水は硬水と軟水により使用する洗剤を選択する。水温は高すぎると血液やタンパクをより強く凝固させるため注意が必要である。

人手による場合、基本的には感染性物質が飛び

散らぬよう流水下の溜まり水の中に浸漬してから次の作業に移る。時間が経過し、乾燥、凝固してしまった血液やタンパク等は、洗浄機に入れる前に浸漬してブラシ洗いなどで除去した後、洗浄する。

作業への汚染暴露、周囲環境への汚染拡大防止などを念頭に置けば、超音波洗浄機、ウォッシャーディスインフェクターなどの自動洗浄機を使用することが望ましいと考えられる。

#### ◆超音波洗浄機（図1）

キャビテーションといわれる細かい泡が破裂した力で汚れを落とし、人の手やブラシでは落とせないような隠れた部分の汚れを取り除くことができる。注意点としては、汚れの粒子に超音波のエネルギーが吸収されるのを防ぐために、超音波洗浄前の汚れ除去が重要となる。

また、超音波洗浄は、周波数や出力により刃先などを劣化させることがあるため、マイクロサージェリー器具は不適である。加えて、超音波効果の減退が大きいため、ゴムやプラスチック製品も不適である。

#### すすぎ

浮遊する汚れや沈殿した汚れ、使用した洗剤（界面活性剤）などの除去のため、すすぎが必要である。最終的なすすぎで純水を用いることができればもっとも望ましい。