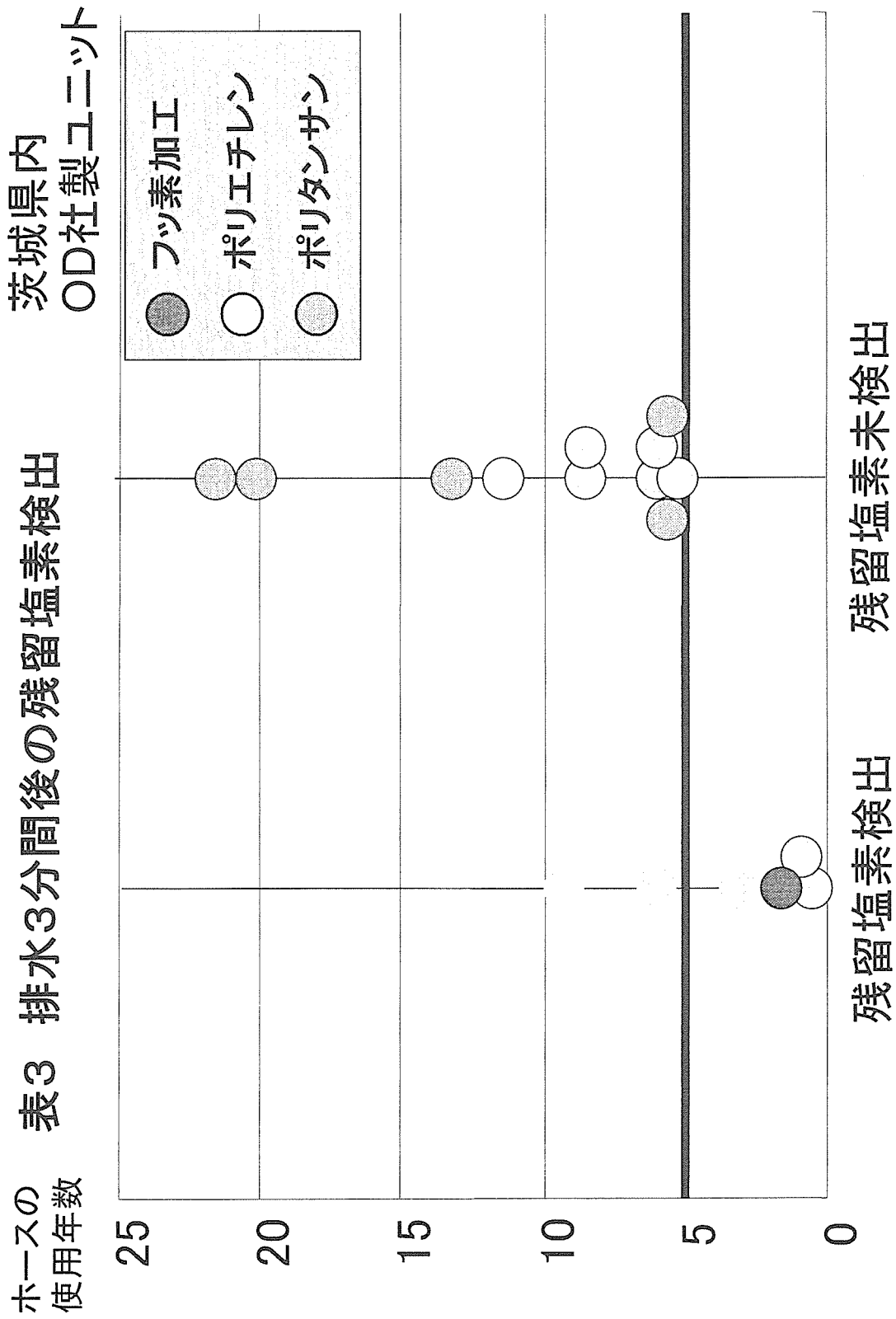


表2 歯科ユニット水質検査 OD社製ユニット

所在地	機種	使用年数	水パイプ材質	ホース
桜川市1 A	ノーベル	9年3ヶ月	ポリエチレン	使用年数 2ヶ月
桜川市1 B	ノーベル	9年3ヶ月	ポリエチレン	9年3ヶ月
桜川市2 C	GM81	15年2ヶ月	ポリタンサン	5年6ヶ月
桜川市2 D	GM81	6年1ヶ月	ポリエチレン	6年1ヶ月
結城市1 E	ノーベル	8年2ヶ月	ポリエチレン	8年2ヶ月
結城市1 F	Z-L	1年2ヶ月	フッ素加工	1年2ヶ月
結城市2 G	GM81	20年6ヶ月	ポリタンサン	20年6ヶ月
結城市2 H	N21	4年9ヶ月	ポリエチレン	4年9ヶ月
古河市1 I	N3000	13年11ヶ月	ポリタンサン	13年11ヶ月
古河市2 J	GM81	21年1ヶ月	ポリタンサン	21年1ヶ月
古河市2 K	GM81	21年1ヶ月	ポリタンサン	5年5ヶ月
古河市3 L	N-L	3年5ヶ月	ポリエチレン	3年5ヶ月
古河市3 M	ノーベル	8年3ヶ月	ポリエチレン	8年3ヶ月
つくば市 N	GM-S	4ヶ月	ポリエチレン	4ヶ月
坂東市 O	FGM-L	12年3ヶ月	ポリエチレン	12年3ヶ月
鉾田市1 P	ノーベル	5年8ヶ月	ポリエチレン	5年8ヶ月



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ー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ー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ー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 ($\mu\text{g/ml}$) 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、バイオフィームを形成させた。使用した薬剤濃度は LVFX 10 x MIC、FOM 3 x MIC、AZM 2, 8, 32 $\mu\text{g/ml}$ であり、薬剤無添加と薬剤作用後のバイオフィー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ームは、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ー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、バイオフィー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ームを形成するものの、LVFX 単独・LVFX・FOM 併用ではバイオフィー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ームを形成した。GFP 産生株が 1 日後に形成したバイオフィームに 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ームの解離を認めた。GFP 非産生株が 2 日後に形成したバイオフィームに 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ー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ー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 バイオフィー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ル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ルムは医学・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、バイオフィル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ルムに対しても抗バイオフィルム剤の開発を行う必要がある。

新しいバイオフィルム実験モデル系の開発と抗バイオフィルム剤の探索を継続することは細菌バイオフィル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) 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.

2. 学会発表

- 1) 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 (神戸大学医学部保健学科看護学専攻 講師)
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。

本年度の主な研究課題として、「治療目的で急性期病院に入院した誤嚥性肺炎患者の口腔および吸引痰から検出された日和見感染菌」に関する検討を行った。患者の多くは脳に器質的な疾患を持っており、咳嗽・嚥下機能および ADL の低下に伴う口腔ケアの不十分さから誤嚥性肺炎に罹患しやすい状態であった。MRSA や緑膿菌などの日和見感染菌が口腔と吸引痰の両検体から検出されており、入院時から退院時まで同一(類似)株が検出されている症例では菌の定着が考えられた。

本研究成果は、院内感染対策の視点から口腔ケアの重要性を示唆しており、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。

平成 16 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い、その研究成果を論文化した。平成 17 年度後半に開始した研究課題「治療目的で急性期病院に入院した誤嚥性肺炎患者の口腔および吸引痰から検出される日和見感染菌」においては、院内感染対策上留意すべきエビデンスを得た。以上の実態調査および細菌学的・分子疫学検討を継続するとともに口腔ケアの評

価を行うことにより、歯科医療における院内感染防止システムの構築に寄与する。

B. 研究方法

誤嚥性肺炎患者に対する口腔ケアのエビデンスを得るために、急性期病院(1施設)に治療目的で入院した患者の口腔内の状態および口腔と吸引痰から検出された日和見感染菌の検出状況について検討した。研究協力の同意が得られた患者9名を対象とした。日和見感染菌の検査は、入院時、入院後3~5日目、退院時の3回、日和見感染菌検査用キット(BML社・東京)を使用して行った。分離された methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) および *Pseudomonas aeruginosa* については、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)により菌株の同一性を検討した。

C. 研究結果

検査対象の日和見感染菌10菌種のうち、MRSA, methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA), *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Candida sp.* の6菌種が検出された。各々の患者(9名)の口腔と吸引痰の検出菌種はほぼ一致していた。例えば、患者Aでは入院時、口腔から *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, 吸引痰から *P. aeruginosa*, MRSA が検出された。入院後3~5日後には、口腔・吸引痰からMRSAが、退院時口腔から *P. aeruginosa*、吸引痰からMRSA, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*が検出された。検出頻度が高く、検出菌量が最も多かったのはMRSAで、続いて *K. pneumoniae* や *P. aeruginosa* であった。MRSAは5名(患者A~E)の口腔または吸引痰のいずれかで検出された

が、そのうち2名(患者D, E)は入院時には検出されず、入院後3~5日目および退院時に 10^4 cfu/ml ~ $\geq 10^7$ cfu/ml のMRSAが検出された。入院時、入院後3~5日目および退院時に口腔または吸引痰から検出された菌種(患者数)を集計した。その結果、入院時: *Candida sp.* (4名)、MRSA (3名)、*S. marcescens* (3名)、*P. aeruginosa* (2名)、*K. pneumoniae*, (2名); 入院後3~5日目: MRSA (5名)、*Candida sp.* (2名)、*P. aeruginosa* (1名)、*K. pneumoniae*, (1名)、*S. marcescens* (1名); 退院時: MRSA (4名)、*P. aeruginosa* (2名)、*K. pneumoniae*, (2名)、*Candida sp.* (2名)、MSSA (1名)であった。PFGE法による検討において、口腔と吸引痰の両検体から検出されたMRSAあるいは *P. aeruginosa* は、入院時(入院後3~5日目)~退院時まで、同一(類似)株であることが明らかとなった。

D. 考察

9名の患者は平均年齢76.9歳と高齢で、抵抗力も低下し、脳血管障害・神経系疾患・胃疾患の既往にADLの低下・認知症など誤嚥性肺炎の危険因子を持つ者が多く、ほとんどの患者が過去にも誤嚥性肺炎を罹患していた。これらの患者の口腔内は、入院前、スポンジブラシなどによる口腔内清拭を受けていても、口腔内清浄度は保たれていなかった。入院後の口腔ケアは、1日1回看護師が実施していたが、患者の口腔衛生は不十分であった。肺炎は回復しても同一(類似)菌が口腔および吸引痰に残存していることから、日和見感染菌が定着状態になっていると考えられた。これらの患者は再度誤嚥性肺炎を罹患する可能性があり、院内感染対策上も留意が必要

である。

E. 結論

誤嚥性肺炎患者の多くは脳に器質的な疾患を持っており、咳嗽・嚥下機能およびADLの低下に伴う口腔ケアの不十分さから誤嚥性肺炎に罹患しやすい状態であった。MRSAや緑膿菌などの日和見感染菌が口腔と吸引痰の両検体から検出されており、入院時から退院時まで同一(類似)株が検出されている症例では菌の定着が考えられた。本研究成果は、院内感染対策の視点から口腔ケアの重要性を示唆しており、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 118: 33-40, 2006.
- 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 16: 79-83, 2006.
- 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 15: 94-99, 2006.

2. 学会発表

- 1) 第22回日本環境感染学会総会：

横浜 2007, 2.23-24

「治療目的で急性期病院に入院した誤嚥性肺炎患者の口腔および吸引痰から検出された日和見感染菌」

形山優子、山本満寿美、千田好子、狩山玲子

- 2) 第22回日本環境感染学会総会：
横浜 2007, 2.23-24

「再使用する気管内吸引カテーテルの洗浄および保管方法に関する検討」

林 由佳、千田好子、犬飼昌子、狩山玲子、光畑律子

分担研究報告書

「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薬学総合研究科 教授
研究協力者 曾我賢彦¹⁾，藤本千代^{1,2)}，前田知子²⁾，大谷久美²⁾，金中章江²⁾，
前田博史¹⁾

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

口腔ケア対象患者の口腔内細菌叢の解析ならびに薬剤耐性菌の検出を行った。結果、易感染状態にある患者ほど耐性菌の保有率が高く、医科領域からの細菌学的情報が得られていない患者から比較的高頻度に MRSA を検出した。また、口腔ケアを行っている群では口腔ケアを行っていない群に比べ、MRSA の保有率が低い傾向にあった。本研究結果は口腔ケアにおける院内感染防止システムの早期構築が必要であることを強く示唆するとともに、院内感染の予防に口腔ケアの実施が必要であることを示唆するものである。

A. 研究目的

造血幹細胞移植患者や要介護高齢者などをかかえる介護施設や病院などにおいては、日和見菌の交差感染によって、院内感染を広げる危険性がある。また、易感染状態の患者においては、正常細菌叢が崩れ、日和見菌が口腔内に定着することがある。我々はこれまでに、歯周治療や口腔ケアに伴って口腔細菌が周囲に飛散することを明らかにした。今回の研究では易感染患者の口腔細菌叢を解析し、さらに口腔ケア対象患者の薬剤耐性菌（MRSA）保有率を調べることで、口腔ケアに伴う院内感染のリスクを評価するとともに、口腔ケアによる院内感染予防の効果について考察する。

B. 研究方法

1. 造血幹細胞移植患者の口腔細菌叢の変化

造血幹細胞移植 91 名を対象とし、移植期（1 ヶ月間）に検出される口腔粘膜上細菌を培養検査によって調べた。

2. 要介護者からの薬剤耐性菌（MRSA）の検出

要介護高齢者 60 名（口腔ケア受診者 30 名、未受診者 30 名）の咽頭部から、滅菌綿棒を用いて 10 秒間スワブしてサンプルを採取し、下記の細菌検査に使用した。

1) 細菌培養検査

培養検査は岡山メディカルラボラトリーに送付して行った。分離培養は、トリプチケースソイ II 5% 羊血液寒天培地およびチョコレート II 寒天培地を用い

て 35°Cの条件下で 5%炭酸ガス培養を 2 日間行った。薬剤感受性については Kirby-Bauer 法による Disk 法で判定した。

2) 等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) による *mecA* および *spa* の検出

LAMP 法を用いて、メチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) および黄色ブドウ球菌特異遺伝子 (*spa*) の増幅を行った。LAMP 反応液は、特異プライマーと鋳型 DNA ならびに Loop DNA amplification kit (栄研化学) を用いて調整した。増幅反応は、反応液を 62°C で 60 分間保温して行い、その後 80°C で 2 分間の加熱処理によって終結させた。増幅 DNA の検出は、SYBR Green I (タカラ) を反応液に添加して目視により判定した。

C. 研究結果

1. 造血幹細胞移植患者の口腔細菌叢の変化

移植期に口腔粘膜上から検出された細菌種は、口腔常在菌のみならず、*Staphylococcus* や *Enterococcus* などの口腔非常在菌が比較的高頻度に検出され、その割合が移植日からの日数が経つにつれて増加することが特徴的であった (表 1)。また、移植期の常在菌、非常在菌、および真菌保有者の割合は、移植からの日数が経過するにしたがって常在菌保有者が減少し、非常在菌保有者が増加する傾向にあった (図 1)。

2. 要介護者からの薬剤耐性菌 (MRSA) の検出

医科での細菌学的検査情報がない要介護者から比較的高頻度に MRSA を検出した。培養検査では 60 名中 8 名から MRSA を検出し

たが、このうち 7 名は歯科での口腔ケアを受けていないものだった (表 2)。LAMP 法での検出結果においてもほぼ同様の結果を得た。また LAMP 法による検査では *mecA* 遺伝子のみが検出される患者が 3 名存在した (表 3)。MRSA 以外では *Pseudomonas aeruginosa* が比較的高頻度に検出された。

D. 考察

造血幹細胞移植患者では移植に伴い、口腔内の細菌叢が大きく変化し、*Staphylococcus* や *Enterococcus* など日和見感染の原因となる口腔非常在菌の検出頻度が高くなった。これは宿主抵抗力の低下と抗生剤の多用によるものであり、日和見感染や院内感染防止のためには抗生剤に依存しない口腔ケアの実践が重要と考えられる。要介護者からは MRSA を比較的高頻度に検出した。さらに、LAMP 法検査の結果から *mecA* 遺伝子のみ保有する表皮ブドウ球菌の存在が示唆された。同時に口腔ケアを受けている患者は歯科未受診の患者に比べて MRSA の検出数が少ない結果を得た。このことは抗生剤に依存しない口腔ケアが MRSA などの薬剤耐性菌による院内感染の予防につながる可能性を示唆するものかもしれない。

E. 結論

易感染性宿主や口腔ケア対象者は高頻度に MRSA などの薬剤耐性菌を保有することが明らかとなった。これにより、口腔ケアにおける院内感染防止システムの早期構築の必要性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
 - 1) 小出康史, 前田博史, 村内利光, 谷本一郎, 苔口 進, 西村英紀, 高柴正悟: 等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) によるメチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) および黄色ブドウ球菌特異的遺伝子 (*spa*) の迅速検出. 日本歯科保存学会秋期学術大会, 2006, 11, 10, 鹿児島.
 - 2) 曾我賢彦, 岩本義博, 谷本一郎, 目黒道生, 工藤値英子, 吉澤さゆり, 山部こころ, 園井教裕, 岩田宏隆, 岡田祐佳, 富山高史, 新井英雄, 西村英紀, 高柴正悟: 造血器腫瘍を中心とした血液疾患患者における歯周病の重症度と *Porphyromonas gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価との関連性に関する研究. 第 49 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2006, 10, 20,
 - 3) 藤本千代, 前田博史, 谷本一郎, 妹尾京子, 大谷久美, 前田知子, 金中章江, 長島義之, 高柴正悟: 口腔ケア時における口腔内細菌の飛散状況. 第 20 回日本顎頭蓋機能学会記念学術大会, 2006, 9, 23, 岡山.
 - 4) 杉浦裕子, 曾我義彦, 高橋郁名代, 黒明安子, 河野古都絵, 高柴正悟: 造血幹細胞移植中に口腔粘膜上から検出される細菌種に対応する口腔内保湿ジェルの抗菌性の検討. 第 20 回日本顎頭蓋機能学会記念学術大会, 2006, 9, 23, 岡山.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表1 移植中に口腔粘膜上から検出された細菌

菌種	検出症例数および頻度					
	移植前7日～ 移植当日	移植後1日～ 7日	移植後8日～ 15日	移植後16日～ 22日	移植後23日～ 30日	
	(n=64)	(n=72)	(n=76)	(n=52)	(n=31)	
口腔常在菌	<i>α-Streptococcus</i> spp.	55 (85.9 %)	63 (87.5 %)	39 (51.3 %)	26 (50.0 %)	20 (64.5 %)
	<i>γ-Streptococcus</i> spp.	17 (26.6 %)	15 (20.8 %)	17 (22.4 %)	8 (15.4 %)	3 (9.7 %)
	<i>Neisseria</i> spp.	34 (53.1 %)	40 (55.6 %)	21 (27.6 %)	9 (17.3 %)	7 (22.6 %)
	<i>Stomatococcus</i> spp.	14 (21.9 %)	15 (20.8 %)	17 (22.4 %)	18 (34.6 %)	8 (25.8 %)
	<i>Corynebacterium</i> spp.	0 (0.0 %)	2 (2.8 %)	2 (2.6 %)	1 (1.9 %)	1 (3.2 %)
口腔非常菌	Coagulase(-) <i>Staphylococcus</i> spp.	11 (17.2 %)	21 (29.2 %)	37 (48.7 %)	27 (51.9 %)	19 (61.3 %)
	<i>Enterococcus</i> spp.	2 (3.1 %)	1 (1.4 %)	5 (6.6 %)	7 (13.5 %)	7 (22.6 %)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (1.6 %)	1 (1.4 %)	1 (1.3 %)	1 (1.9 %)	1 (3.2 %)
	<i>Staphylococcus aureus</i>					
	Methicillin sensitive	1 (1.6 %)	2 (2.8 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)
	Methicillin resistant	2 (3.1 %)	1 (1.4 %)	1 (1.3 %)	1 (1.9 %)	0 (0.0 %)
	<i>Bacillus</i> spp.	1 (1.6 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	1 (1.9 %)	0 (0.0 %)
真菌	<i>Candida albicans</i>	1 (1.6 %)	2 (2.8 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	1 (3.2 %)
	<i>Torulopsis glabrata</i>	10 (15.6 %)	7 (9.7 %)	3 (3.9 %)	3 (5.8 %)	3 (9.7 %)
	<i>Candida kuusei</i>	1 (1.6 %)	2 (2.8 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)

表2 要介護者の細菌培養検査結果

検出細菌	口腔ケア無				口腔ケア有			
	検出細菌量				検出細菌量			
	極少	1+	2+	total	極少	1+	2+	total
MRSA	2	4	1	7		1		1
MSSA	1	1		2		1		1
PISP		1	1	2				0
PSSP			1	1				0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1		1	2	3	1		4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1			1		1		1
GBS	1	2	3	6		5	3	8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1			1	1	2		3
<i>Corynebacterium</i> spp.		3	3	6		5	2	7
<i>Citrobacter freundii</i>		1		1				0
<i>Enterococcus</i> sp.	1			1				0
<i>Enterobacter cloacae</i>		1		1	1	1		2
<i>Escherichia coli</i>		1		1				0
<i>Micrococcus</i> sp.	1	5	1	7		8	2	10
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	1	3		3	1	4
<i>Providencia rettgeri</i>		2		2	1	1		2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		1		1				0
<i>α-Streptococcus</i>		11	8	9		10	15	25
<i>γ-Streptococcus</i>		2		2		7	1	8
<i>Neisseria</i> sp.	2	15	2	19	3	10	5	18
<i>Bifidobacterium</i> sp.				0		1		1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>				0		1		1
<i>Veillonella</i> sp.				0		1	1	2

MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA: methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*,
PISP: penicillin-intermediate *Streptococcus pneumoniae*, PSSP: penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*
GBS : *Streptococcus agalactiae*

表 3

LAMP 法によるメチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) および黄色ブドウ球菌特異的遺伝子 (*spa*) の検出

患者 (人)	<i>mecA</i> + / <i>spa</i> +	<i>mecA</i> + / <i>spa</i> -	<i>mecA</i> - / <i>spa</i> +	<i>mecA</i> - / <i>spa</i> -
口腔ケア有	2	0	2	26
口腔ケア無	5	3	1	21

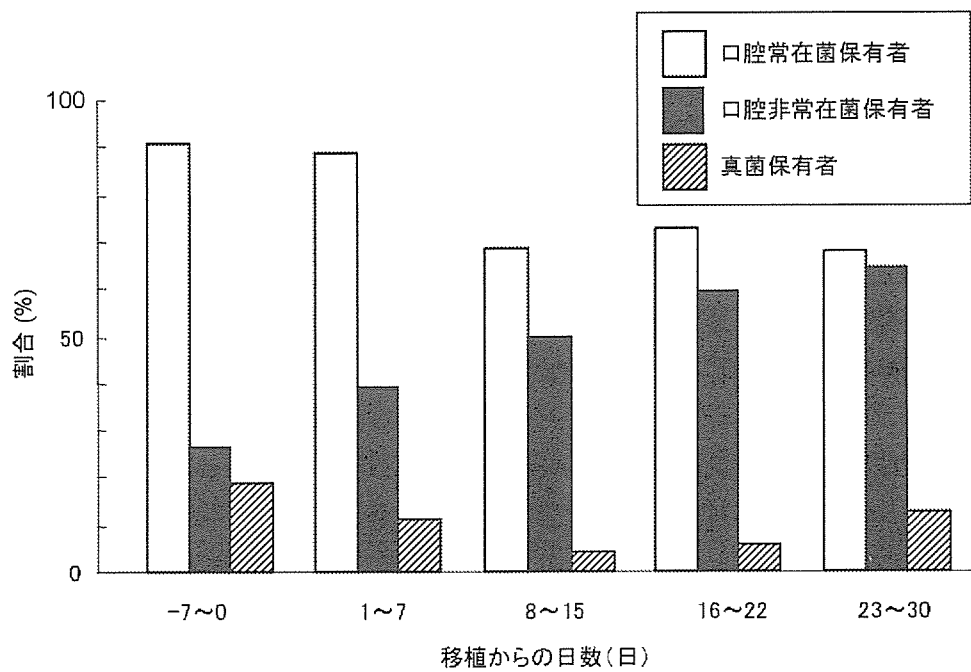


図1 常在菌, 非常在菌および真菌保有者の割合の推移

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（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 健康増進歯学分野）

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のその実態に関しては不明な点が多い。とりわけ日常歯科臨床の場における日和見菌の動態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、歯科治療中手指で触れることの多い箇所から日和見菌の検出を試みることで、歯科臨床における院内感染リスクの可能性について検討した。

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菌が患者から患者へ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、そのまま消毒を怠り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れることの多い場所としてチェア駆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菌の検出を試み、簡易消毒の効果を検討した。

B. 方法

1. 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・エル社へ送付し、同社製日和見感染検出キットを用いた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。
2. 上記 1 とは別に、市内の統合失調症お

よび高齢者施設に併設された歯科診療室受診患者 30 名（男性 14 名、女性 16 名、年齢 29 - 84 歳、平均 59.8±14.7 歳）を対象として同様の調査を行った。本施設における調査ではチェア駆動ボタンのみを対象とした。

C. 結果と考察

1. 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菌は検出されなかった。
2. 統合失調症および高齢者施設における検討では、歯科診療後 30 サンプル中 6 サンプルから日和見菌が検出された。内訳はカンジダ属 2 名、MRSA 1 名、MRSA および *Klebsiella pneumoniae* 1 名、*K. pneumoniae* 1 名、*K. pneumoniae* および *Pseudomonas aeruginosa* 1 名であった。

今回、大学病院における歯科診療後のサンプル 40 例中 2 例から、また統合失調症および高齢者施設における 30 サンプル中 2 サンプルで、チェア駆動ボタンからカンジダ属の菌を培養によって検出した。カンジダ属は市中肺炎の起炎菌ではないが、院内肺炎（Hospital-acquired pneumonia：「入院後 48 時間以上を経っ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。

一方、高齢者施設ではカンジダ属とは別に MRSA が 2 サンプルから、その他 *K. pneumoniae*、*P. aeruginosa* が検出された。*K. pneumoniae*、*P. aeruginosa* は市中肺炎、院内発症肺炎のいずれからも検出されることが知られている。さらに、*K. pneumoniae*、*P. aeruginosa* はしばしば入院患者の喀痰から分離されることも報告されている。これらのことから肺炎リスクの高い入所者を多く抱える高齢者施設に併設する歯科においては特に注意を払う必要があると考えられる。

いずれの施設においても、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における患者毎の清拭は必須であると考えられた。ただ、ノロウイルス等のウイルスはアルコールでは消毒されず次亜塩素酸ナトリウムで不活化されることから、今後はウイルスの伝播にも目を向けた取り組みが必要となるかもしれない。

D. 結論

日常歯科臨床の場において、清潔不潔の区別をつけにくい境界領域で日和見菌が残存し消毒を怠ると院内感染の原因となる可能性が示唆された。処置後の徹底した清拭が必須のものであると考えられる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. Taniguchi A, Fukushima M, Ohya M, Nakai Y, Yoshii S, Nagasaka S, Matsumoto K, Taki Y, Kuroe A, Nishimura F, Seino Y.: Interleukin 6, adiponectin, leptin, and insulin resistance in nonobese Japanese

type 2 diabetic patients. *Metabolism*, 55:258-262, 2006.

2. Nishimura F, Taniguchi A, Yamaguchi-Morimoto M, Soga Y, Iwamoto Y, Kokeyuchi S, Kuroe A, Fukushima M, Nakai Y, Seino Y. : Periodontal infection and dyslipidemia in type 2 diabetes. -Association with increased HMG-CoA reductase expression-. *Horm Metab Res*, 38:530-535, 2006.
3. Nomura Y, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Nishimura Y, Kuroe A, Ohgushi M, Ohya M, Murayama Y, Seino Y. Soluble TNF receptor and periodontal disease in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res*, 38:638-639, 2006.
4. Yoshizawa, S, Meguro M, Ohyama H, Takeuchi-Hatanaka K, Matsushita S, Takashiba S, Nishimura F. Focal adhesion kinase (FAK) mediates human leukocyte histocompatibility antigen (HLA) class II-induced signaling in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, in press, 2007.
5. Akazawa H, Nishimura F, Maeda H, Takashiba S, Mine A, Maekawa K, Kuboki T. Regression of pustulosis palmaris et plantaris by periodontal treatment in subject with severe periodontitis. *Int J Dermatol*, 45:1420-1422, 2006.
6. Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. Periodontal host response with diabetes. *Periodontology 2000*, 43:245-253, 2007.

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 法を用いた病原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薬学総合研究科 助教授
研究協力者 前田博史、小出康史、渡辺朱理*、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、*口腔微生物学分野
**広島大学大学院医歯薬学総合研究科 健康増進歯学分野

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) 法を用いて院内感染対策において薬剤耐性菌として問題視されるメチシリン耐性ブドウ球菌の検出法を確立した。

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。これまでにこの LAMP 法を用いて、*Porphyromonas gingivalis* をはじめ各種歯周病細菌の簡便で迅速な検出方法を確立できた。そこで、現在、院内感染で特に薬剤耐性菌として問題視されているメチシリン耐性ブドウ球菌について LAMP 法による検出方法を確立し、歯科医療における院内感染防止システムに役立てることを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)：岡山大学病院に保存されている臨床分離株 5 株、メチシリン耐性表皮ブドウ球菌 (MRSE)：岡山大学病院に保存されている臨床分離株 3 株、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA)：FDA209、NBRC14462、15035、100910、臨床分離株 4 株、メチシリン感受性表皮ブドウ球菌 (MSSE)：NBRC12993、ATCC155、12228、14990、11D866、口腔内細菌：*Streptococcus mutans*、*Enterococcus faecalis*、*Streptococcus sanguis*、*Streptococcus salivarius* を用いた。

2. DNA 抽出：サンプルの DNA 抽出は InstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いて培養した各供試菌 (10~10⁵ 個) から調製した。

3. LAMP プライマー設計：メチシリン耐性遺伝子 *mecA* (メチシリン耐性遺伝子) と *spa* (黄色ブドウ球菌特異遺伝子) とを標的に

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。LAMP 反応液は、設計したプライマーと鋳型 DNA ならびに Loopamp DNA amplification kit を用いて調製した。増幅反応は反応液を 62°C で 60 分間保温して行い、その後 80°C で 2 分間の加熱処理によって終結させた。増幅 DNA の検出は、電気泳動法による判定と目視による判定の両者で行った。電気泳動には 1.5% のアガロース・ゲルを用い、目視判定は SYBR Green I (タカラ) を反応液に添加することで行った。

5. 特異性試験：LAMP 法と並行して、既報の PCR 法を用いて *mecA* ならびに *spa* 遺伝子を検出し、両者の結果を比較することによって、設計した LAMP プライマーの特異性を検討した。

6. 検出感度試験：*mecA* ならびに *spa* 遺伝子を保有する菌株から抽出したゲノム DNA を段階希釈して鋳型サンプルを調整し、LAMP 法による両遺伝子の検出感度を調べた。

C. 研究結果

1. PCR 法と LAMP 法によって 10⁵ cells/tube に調整した供試菌から *mecA* ならびに *spa* を検出したところ、両法の検出結果は完全に一致した。すなわち、すべての

MRSAならびにMRSEから *mecA* 遺伝子を、そしてMRSAならびにMSSAから *spa* 遺伝子を検出することができた。

2. 60分のLAMP反応による *mecA* の検出感度は、電気泳動による検出方法で1 cell (MRSA)/tubeであり、目視判定法では10 cells (MRSA)/tubeだった。*spa* の検出感度は電気泳動、目視判定のいずれの検出方法においても1 cell (MRSA)/tubeだった。

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、迅速性と簡便性に優れた方法であり、ベッドサイドやチェアサイドでの臨床検査にも応用が可能であると考えられる。院内感染対策で問題となる様々な病原細菌や薬剤耐性菌の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法を適用して他の薬剤耐性菌(VRE、多剤耐性緑膿菌)や日和見感染症の原因菌の検出法の開発に繋げたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuneishi M., Yamamoto T., Kokeyuchi S., Tamaki N., Fukui K., Watanabe T. : Composition of the bacterial flora in tonsilloliths. *Microbes and Infection*, 8(9-10):2384-2389, 2006.

Nishimura F., Taniguchi A., Yamaguchi-Morimoto M., Soga Y., Iwamoto Y., Kokeyuchi S., Kuroe A., Fukushima M., Nakai Y., Seino Y. : Periodontal Infection and Dyslipidemia in Type 2 Diabetics: Association with Increased HMG-CoA Reductase Expression. *Hormone and Metabolic Research*, 38, (8), 530-535,

2006.

狩山玲子, 大西令子, 伊東秀之, 吉田隆志, 波多野 力, 苔口 進, 光畑律子, 和田耕一郎, 門田晃一, 公文裕巳: 大腸菌性バイオフィーム形成抑制活性を有するクランベリー尿中代謝物の探索. *Bacterial Adherence & Biofilm*, 2007(印刷中).

2. 学会発表

日本環境感染学会 学術集会(第21回) (東京都, ホテル日航東京) 平成18年1月.

日本歯周病学会学術大会第49回秋季学術大会 (大阪府, 大阪国際交流センター) 平成18年10月.

日本歯科保存学会 2006年秋季学術大会(第125回) (鹿児島県, 鹿児島市民文化ホール) 平成18年11月.

日本歯科医療管理学会中国支部平成18年度学術大会(山口県, 山口県歯科医師会館) 平成18年11月.

日本食品科学工学会関西支部第38回シンポジウム(大阪府, 千里ライフサイエンスセンター) 平成18年11月.

日本歯科衛生士学会 第1回学術大会(東京都, 東京国際フォーラム) 平成18年11月.

第13回岡山県保健福祉学会(おかもま保健福祉研究会) (岡山県, きらめきプラザ) 平成19年2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
—HIV/AIDS および MRSA に関する意識調査—

分担研究者 荅口 進 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 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

歯学科学生、歯科衛生士学校生および非医療系大学生に対して HIV/AIDS および MRSA さらにはその感染防止対策の知識や関心などに関してアンケート調査を行ない、現状分析を行なった。

A. 研究目的

これから歯科臨床教育を受けて、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する病原微生物や感染防止対策に関する教育やそれらへの知識や意識の向上が今後の歯科医療における感染防止対策に繋がると考える。歯学部学生および歯科衛生士学校生を対象に院内感染防止対策で問題となる HIV/AIDS および MRSA に関する知識や意識についてアンケート調査を行ない、評価し、院内感染防止対策に繋げる。

歯科医師・歯科衛生士が HIV に感染した際の行動、HIV に感染した歯科衛生士の処遇、HIV/AIDS 者が来院した際の対応等

- 2) MRSA に関して：MRSA の認知度、MRSA に対する 70%アルコールの効果、MRSA の生息部位、MRSA の感染様式、MRSA の治療薬、MRSA 感染者とのとの歯ブラシの共用ならびに歯科治療時に使用した手袋の再利用の可否、歯科医師・歯科衛生士が MRSA に感染した際の行動、MRSA に感染した歯科医療従事者の処遇、MRSA 感染者が来院した際の対応等

B. 研究方法

1. 対象者：803 名（歯学科学生 336 名、歯科衛生士学校生 106 名、非医療系学生 361 名）で、平均年齢は 21.1 歳であった。
2. アンケート調査および質問内容：HIV/AIDS および MRSA 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。質問内容の概略は以下の通りである。
 - 1) HIV/AIDS に関して：AIDS の認知度、AIDS と HIV の区別、HIV と AIDS の学習経験、HIV/AIDS 者との歯ブラシの共用ならびに歯科治療時に使用した手袋の再利用の可否、通院中の歯科医院に HIV/AIDS 者が受診している際の行動、

C. 研究結果

1. HIV/AIDS に関して：AIDS を知っている学生は、3 学生群共に 9 割以上であったが、過半数以上が AIDS と HIV の区別がつかなかった。衛生面に関しては、3 学生群共に「歯ブラシの共有、手袋の再利用をすべきでない」との回答が多かった。受診行動に関しては、3 学生群合計で HIV/AIDS 者を治療している歯科医院に「通院する」と「通院しない」が半々の結果であった。歯科医師・歯科衛生士が HIV に感染した時、「歯科医療を続けるべきではない」が 3 学生群共に過半数を超えた。また、HIV に感染した歯科衛生士の処遇は、「感染の危険性のない部署への異動」

が最も多い回答を得た。HIV/AIDS 者への診療補助を拒否すると回答した歯科衛生士学校生が過半数を超えた。

2. MRSA に関して：MRSA を知っている学生は、歯科衛生士学校生と歯学科学生では約 70%であったが、非医療系大学生で 5.3%であったが、MRSA が接触感染することを「知っている」学生は、歯学科学生 63.4%に対し、歯科衛生士学校生 12.3%であった。また、70%エタノールの有効について「知っている」学生は、歯学科学生 55.7%に対し、歯科衛生士学校生 23.6%であった。特に、歯科衛生士学校生や非医療系大学生では、常在部位、一般的な治療薬を「知っている」との回答は皆無であった。次に、衛生面に関する「歯ブラシの共有」や「手袋の再利用」の質問では、3 学生群共、ほぼ全員が「避けるべき」と回答した。「歯科医師の MRSA 感染後医療行為」および「歯科衛生士の MRSA 感染後アシスタント行為」では、歯科衛生士学校生の方が歯学科学生よりも「続けるべきでない」と考える学生が多かった。また、「MRSA 感染者の歯科診療拒否」に関しては、「拒否する」と回答した学生は、歯学科学生の 24.7%に比べて歯科衛生士学校生は 45.3%と高かった。

D. 考察

諸学生の HIV/AIDS に対する拒否感は強く、HIV/AIDS 者への対処方法では、法的観点から問題がある点も見受けられた。HIV/AIDS に対する感染防止に関する歯学科学生と歯科衛生士学校生への教育は、歯科的観点に加え、法律学や行動科学等を含めた総合的な教育が必要である。歯学科学生および歯科衛生士学校生は、MRSA の存在を知っている割合は非医療系大学生に比べ高かったが、感染様式やそれに対する感染制御学の基礎知識はまだ充分でないと推測される。また、今回の調査から感染防止の予防策や MRSA 感染者に対する誤った認識を持っている点も明らかとなった。現在、歯科医療は、要介護高齢者や易感染性長期入院患者の口

腔ケアなどへの領域に広がってきており、今一層の感染防止の基礎知識と技術を身につけておく必要がある。今後、歯学科学生および歯科衛生士学校生への更なる感染制御学の教授の充実と専門資格の充実など多様な教育の充実が望まれる。

E. 結論

歯学部学生および歯科衛生士学校生を対象に感染防止対策で問題となる HIV/AIDS および MRSA に関する知識や意識についてアンケート調査を行ない、非医療系学生と比較して病原微生物や感染防御に対する意識や関心度が高いことがわかった。しかしながら、感染者への対処（拒否感や偏見）では問題点も浮かび上がり、さらに様々な病原微生物に対する正しい感染防止の知識と実践的な技術を身につけることが必要である。個々の病原微生物（HBV、HCV、結核など）に関して引き続きアンケートによる意識調査を行ない、感染防止対策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, 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～歯学科学生、歯科衛生士学生、非医療系大学生における HIV/AIDS に対する意識調査～. 医学と生物学 第 150 巻, 第 6 号, p. 216-228, 2006.

佐藤法仁：歯科における感染制御専門家養成への提言. 政策空間 vol. 36, p. 14-15, 2006.

佐藤法仁：介護における感染制御の必要性について. 政策空間 vol. 37, p. 20-22, 2006.

渡辺朱理, 佐藤法仁, 苔口進, 福井一博：