

表2 スリーウェイシリンジ、タービン、水道からの水における微生物汚染検査

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
D	平成2年7月	スリーウェイシリンジ	—	0	1.2×10^6	—	—	—	—	—
		タービン	—	0	0	—	—	—	—	—
		水道水	—	0	0	—	—	—	—	—
E	昭和62年12月	スリーウェイシリンジ	—	0	0	—	—	—	—	—
		タービン	—	0	0	—	—	—	—	—
		水道水	—	0	0	—	—	—	—	—
F	平成18年8月	スリーウェイシリンジ	—	0	0	—	—	—	—	—
		タービン	—	0	0	—	—	—	—	—
		水道水	—	0	0	—	—	—	—	—
G	平成18年10月	スリーウェイシリンジ	—	0	0	—	—	—	—	—
		タービン	—	0	0	—	—	—	—	—
		水道水	—	0	0	—	—	—	—	—
H	昭和59年	スリーウェイシリンジ	—	8.3×10^6	0	—	—	—	—	—
		タービン	—	2.2×10^6	0	—	—	—	—	—
		水道水	—	0	0	—	—	—	—	—

口腔ケア時における口腔内細菌の飛散状況

前田知子¹⁾，大谷久美¹⁾，金中章江¹⁾，藤本千代^{1,2)}
 宮川淳子²⁾，前田博史²⁾，高柴正悟²⁾
 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¹⁾。口腔バイオフィルムを形成性する細菌には、齲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²⁾。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^{3,4)}。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るとはいえない。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 cm² 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⁵⁾および村上ら⁶⁾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, Fujimoto⁷⁾らおよび石井ら⁸⁾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, 汚染の程度が大きいことがわかった。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細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処置の際にも, 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⁹⁾。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^{10,11)}。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^{3,4)}。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, Kokeyuchi 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, Kokeyuchi 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 Infect*, **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'-cttgacttcagtggcggcag-3' R : 5'-aggaagacggtttcacca-3'
Pi	F : 5'-aatacccgatggtgccaca-3' R : 5'-ttagccggtcctattcgaa-3'
総細菌	F : 5'-gtgStgcaYggYtgtcgca-3' R : 5'-acgtcRtccMcaccttcctc-3'
<i>mec A</i>	F : 5'-aaaatcgatgtaaaggttggc-3' R : 5'-agttctgcagtaccggatttgc-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 ^a
GC-341F	5'-GC クランプ ^b -cctacgggaggcagcag-3'	341-357
907R	5'-ccgtcaattcctt(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 cgcccgcgcgccccgcgcccgtcccgcgccccgcgcccgcg

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

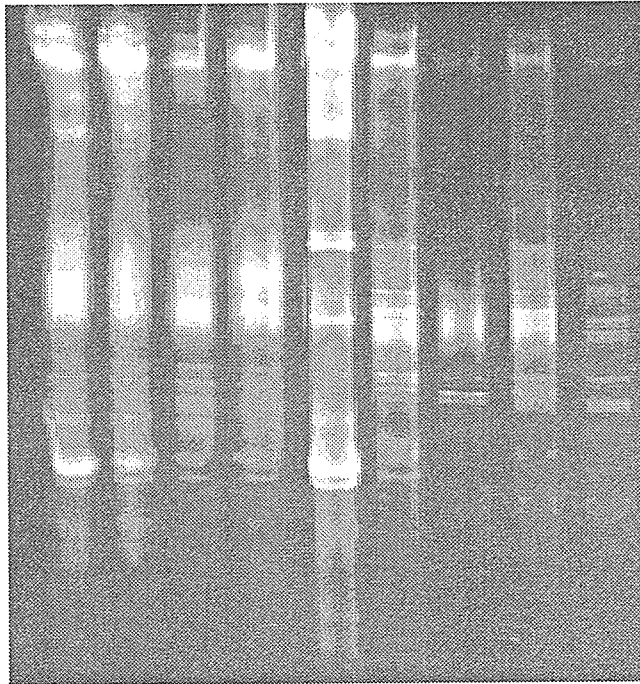


図 1 サンプルから増幅した 16SrDNA の DGGE 像
1 : H3 mouth, 2 : H3 breast, 3 : H3 r. wall,
4 : H3 l.wall, 5 : X4 mouth, 6 : X4 breast,
7 : X4 r. wall, 8 : X4 DH face, 9 : X4 l. wall

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ピン(Ara-C)大量療法後に口内炎を来した患者には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

ッカームーカス[®]、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、口腔の不快症状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℃ 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℃ 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., *Stenotrophomonas 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

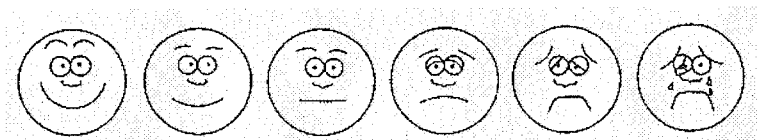
ペインスコアの変化	人数(名 / 18名)
改善した	9
変化なし	9
悪化した	0

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