

- Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model. *J Infect Chemother* 13: 285-290, 2007.
- 2) 狩山玲子、門田晃一、公文裕巳: 緑膿菌性尿路感染症対策としての抗バイオフィルム剤探索とその基盤技術の開発. 第41回緑膿菌感染症研究会講演記録 41: 39-43, 2007.
 - 3) 渡辺豊彦、上原慎也、光畑律子、和田耕一郎、石井亜矢乃、狩山玲子、門田晃一、公文裕巳: 尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィルム形成能と臨床的因子および薬剤感受性との関連性に関する検討. 第41回緑膿菌感染症研究会講演記録 41: 94-98, 2007.
 - 4) 狩山玲子、光畑律子、村谷哲郎、松本哲朗、門田晃一、公文裕巳: バンコマイシン耐性腸球菌 (*VanA* 型 *Enterococcus faecalis*) のバイオフィルム形成能に関連する基礎的検討. *Bacterial Adherence & Biofilm* (印刷中)
2. 学会発表
- 1) 第81回日本感染症学会総会 : 京都 2007, 4. 10-11
ワークショップ: 薬剤耐性と対策-GPC
「本邦で分離された *VanA* 型 *Enterococcus faecalis* (VRE) のバイオフィルム形成能および薬剤耐性遺伝子の伝達性に関する検討」
狩山玲子、村谷哲郎、松本哲朗、門田晃一、公文裕巳
 - 2) 第21回 *Bacterial Adherence & Biofilm* 学術集会 : 東京 2007, 7. 7
「バンコマイシン耐性腸球菌 (*VanA* 型 *Enterococcus faecalis*) のバイオフィルム形成能に関連する基礎的検討」
狩山玲子、光畑律子、村谷哲郎、松本哲朗、門田晃一、公文裕巳
 - 3) 第55回 日本化学療法学会西日本支部総会 : 神戸 2007, 10. 29-31
「緑膿菌性バイオフィル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に関する新知見」
狩山玲子、門田晃一、公文裕巳
 - 4) 第42回 緑膿菌感染症研究会 : 東京 2008, 2. 1-2
「メタロ- β -ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能と耐性遺伝子伝達性の検討」
山本満寿美、狩山玲子、光畑律子、石井亜矢乃、上原慎也、渡辺豊彦、門田晃一、公文裕巳、草野展周

厚生労働科学研究費補助金(地域医療基盤開発推進研究事業)
分担研究報告書

「歯科医療における院内感染対策の評価指標の開発と有効性の検証」

「院内感染における薬剤耐性菌の評価指標の開発」

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 助教)
研究協力者 山本満寿美 (福山平成大学看護学部 助教)
森 みずえ (九州看護福祉大学 講師)
千田好子 (岡山大学大学院保健学研究科 非常勤講師)
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

急性期病院に治療目的で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 MRSA と緑膿菌について、分子疫学的解析を行った。その結果、院内での交差感染が示唆される症例があり、専門的口腔ケアを含めた感染防止対策を強化する必要性が示唆された。一方、気管内吸引を必要とする在宅療養患者の口腔および気管内吸引カテーテルの洗浄液・浸漬液からは、薬剤耐性菌を含む多数の日和見感染菌が検出された。口腔ケアを含めた感染管理が不十分な状況が明らかになり、誤嚥性肺炎のリスクを回避するための専門的口腔ケアの必要性が示唆された。

本研究成果は、地域医療連携による感染対策の視点においても、口腔ケアの重要性を示唆しており、口腔ケアへの介入には歯科医師や歯科衛生士との連携が重要となる。

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、歯科医療における院内感染対策の評価指標の開発を行う上で、重要な研究課題である。

本年度より、誤嚥性肺炎患者ならびに気管内吸引を必要とする在宅療養患者を対象として、口腔・吸引痰および気管内吸引カテーテル(カテーテル)の洗浄液・浸漬液から検出された薬剤耐性菌に着目し、細菌学的・分子疫学的検討を開始した。

①急性期病院に治療目的で入院した誤嚥性肺炎患者について、院内感染の有無

を検証するため、患者の口腔および吸引痰から検出された MRSA と緑膿菌の分子疫学的検討を行った。②気管内吸引を必要とする患者は、嚥下機能の低下による誤嚥や口腔内の病原微生物の流れ込みにより、肺炎となる危険性が高い。そこで、在宅における有効な感染管理法を考究するために、カテーテルの感染管理と口腔ケアの現状を調査し、細菌学的検討を行った。

以上の研究を推進することにより、歯科医療における院内感染対策の評価指標の開発と有効性の検証に寄与する。

B. 研究方法

①日和見感染菌検査用キットを使用し、入院時・入院後3～5日目・退院時の3回、口腔と吸引痰からサンプルを採取した。培養・同定はBML社に依頼し、 10^4 cfu/ml以上の菌量に相当するとして患者6名から分離されたMRSA18株(5名分)と緑膿菌10株(2名分)について、パルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子解析を行った。MRSAには制限酵素 *Sma* I、緑膿菌には *Spe* I を用い、常法により泳動後ゲルを撮影し、デンドログラムの類似係数70%以上(MRSA)および75%以上(緑膿菌)を同一タイプとした。緑膿菌10株は、PCR法にてメタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子(IMP-1型とVIM-2型)を検索した。

②2県3市において訪問看護を受けている気管内吸引の必要な患者20名を対象として、感染管理に関する聞き取り調査を行った。次に日和見感染菌検査用キットにより患者の歯垢を採取し、BML社に培養・同定を依頼した。また、気管内吸引の前後に使用するカテーテル洗浄水と浸け置き用の浸漬水を採取し、フィルター法により集菌し、培養・同定を行った。

C. 研究結果

①MRSAまたは緑膿菌は、患者6名中5名において、口腔と吸引痰の両サンプルから検出された。MRSA18株は、I型[4株(患者A)]・II型[6株(患者BとC)]・III型[8株(患者DとE)]の3タイプに型別された。採取時期別内訳では、入院時はII型のみ、入院後3～5日目と退院時は3タイプ全てが分離された。緑膿菌10株は、I型[4株(患者C)]・II型[6株(患者F)]の2タイプに型別された。入院時と退院時は両タイプ、入院後3～5日目はタイプIIのみであった。これらの緑膿菌はメタロ- β -ラクタマーゼ

遺伝子を保有していなかった。

②患者20名のうち、半数が小児期を中心とする重症心身障害者で、18名が長期臥床状態であった。1日の吸引回数は10～20回以上で、カテーテルはすべて再使用され、その6割は24時間ごとに交換されていた。1日1～2回の口腔ケアを受けていた患者は19名いた。口腔から 10^5 cfu/ml以上の菌量に相当する菌量で検出された菌種(患者数)は、*P. aeruginosa* (13名)、*S. marcescens* (8名)で、他にMRSA、MSSA、 β -*Streptococcus*、*K. pneumoniae* が検出された。カテーテル洗浄液・浸漬液から検出された菌種(患者数)は、*P. aeruginosa* (14名)、*S. marcescens* (6名)等のグラム陰性桿菌であった。カテーテルの消毒および保管方法に関係なく、グラム陽性菌を含む複数の菌種が分離されたケースもあり、6名の洗浄液または浸漬液から 10^5 cfu/ml以上の菌量が検出された。

D. 考察

①患者DとEは、入院時にMRSAは検出されなかったが、入院後3～5日目と退院時に同一タイプのMRSAが検出された。この2名は同時期・同室に入院していたことから交差感染が示唆された。入院中全患者に抗菌薬が投与されていたが、半数の患者は入院から退院時まで、MRSAまたは緑膿菌が定着した状態であったと推察された。本検討において、メタロ- β -ラクタマーゼ産生緑膿菌は検出されなかった。しかし、MRSAの交差感染が示唆されたこと、およびMRSAまたは緑膿菌が定着した状態で誤嚥性肺炎患者が退院していることから、感染予防対策を強化することが重要である。

②過半数の患者の口腔から日和見感染菌が多量に検出され、口腔ケアが不十

分であることは明らかであり、専門職による口腔ケアの必要性が示唆された。また、カテーテル洗浄液・浸漬液の消毒効果は不十分であったため、これらの交換頻度や消毒薬の選択・添加濃度など、適切な管理方法について検討していくことも必要である。

E. 結論

急性期病院に治療目的で入院した誤嚥性肺炎患者において、院内での交差感染が示唆される症例があり、専門的口腔ケアを含めた感染防止対策を強化する必要性が示唆された。一方、気管内吸引を必要とする在宅療養患者においては、誤嚥性肺炎のリスクを回避するための専門的口腔ケアの必要性が示唆された。

本研究成果は、地域医療連携による感染対策の視点においても、口腔ケアの重要性を示唆しており、口腔ケアへの介入には歯科医師や歯科衛生士との連携が重要となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 野村佳代、大野勝雄、光畑律子、渡邊久美、犬飼昌子、狩山玲子、千田好子：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汚染状況の比較検討。INFECTION CONTROL メディカ出版 16: 86-90, 2007.
- 2) 形山優子、山本満寿美、千田好子、狩山玲子：誤嚥性肺炎患者の口腔内の状態と口腔ケアおよび口腔と吸引痰からの検出菌に関する実態調査。(投稿中)

2. 学会発表

- 1) 第23回日本環境感染学会総会：長崎 2008, 2.22-23

「誤嚥性肺炎患者の口腔および吸引痰から検出されたMRSAと緑膿菌の分子疫学的検討」

山本満寿美、形山優子、千田好子、光畑律子、狩山玲子

- 2) 第23回日本環境感染学会総会：長崎 2008, 2.22-23

「気管内吸引を必要とする在宅療養患者に対する感染管理と口腔ケアの実態調査および細菌学的検討」

森 みずえ、千田好子、光畑律子、狩山玲子

厚生労働科学研究費補助金（医療安全・医療技術評価総合）
分担研究報告書

歯周病診療における院内感染の評価指標の開発とその有効性
—易感染性患者の口腔内細菌叢の評価指標の開発に向けた分子生物学的細菌検査法の応用
とその有用性の検討—

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・歯周病態学分野・教授

研究協力者：谷本一郎¹，前田博史¹，苔口進²，曾我賢彦¹

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・歯周病態学分野¹，口腔微生物学分野²

研究要旨

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、治療に際しては院内感染の対策が必須となる。今回、造血幹細胞移植患者の口腔細菌叢を培養法、クローンライブラリー法、そして T-RFLP 法（Terminal Restriction Fragment Polymorphism）によって移植前後で解析するとともに、各検査法の有用性について検討した。結果、T-RFLP 解析によって移植後には、口腔内に生息する細菌種の数が増加することが示された。これは、易感染状態にある患者の口腔内で容易に菌交代現象が起こることを示唆するものと考えられる。しかしながら、口腔内細菌叢は多様性を示し、移植に伴う細菌叢の変化は個々の患者で異なっていた。このため、感染対策や治療にともなう細菌検査の指標となるような細菌種は特定できなかった。さらに、各検査法の結果を比較したところ、培養法では検出が困難な細菌種が多く存在することが明らかとなった。易感染性宿主の歯科治療に際し、院内感染対策や治療のための細菌学的評価には、分子生物学的手法を応用した細菌叢の解析が必要であると考えられる。

A. 研究目的

造血幹細胞移植とは、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、あるい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行われるものである。近年、口腔内の感染源が患者の全身状態に影響することが示唆されはじめており、移植前には歯周病治療をはじめとした歯科治療によって口腔内の感染巣を除去する必要がある。これらの易感染性患者を対象とした歯科医療の実施に際しては、特に院内感染の防止に重点を置いた治療のあり方が要求される。このため、患者の口腔内細菌叢を把握しておく

ことが重要となる。本研究は培養法、クローンライブラリー法そして T-RFLP 法を造血幹細胞移植患者に応用し、移植前後での細菌叢を解析することによって、移植患者の歯科領域における細菌学的検査の指標を検索するとともに、各検査法の有用性について検討するものである。

B. 研究方法

1. 対象患者とサンプリング

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7名を対象とした。細菌検査用のサンプルは移植前7日の期間に1回、そして移植後14日までの期間で2回採取した。なお、サンプルは綿棒を用いて頬粘膜から採取した。

2. 培養検査

培養法による細菌種の同定は、岡山大学医学部・歯学部附属病院中央検査室に依頼し、一般細菌好気培養検査によって行った。

3. DNA抽出

患者から採取したサンプルの一部からDNAを抽出し、クローンライブラリー法、T-RFLP解析に供試した。DNA抽出にはInstaGene Matrix (Bio-Rad)を使用した。

4. クローンライブラリー法

抽出したDNAサンプルからPCR法によって16S rDNAを増幅させ、増幅DNA断片をTopoTAクローニングキット (Invitrogen) を用いてクローン化し、塩基配列を解析した。解析した塩基配列を遺伝子データベースと照合し、細菌種の同定を行った。

5. T-RFLP解析

DNAサンプルを鋳型とし、蛍光標識(6-FAM)したプライマーによって細菌16S rDNAを増幅した。増幅断片は制限酵素 *MspI* で消化し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerによって断片長の解析を行った。

C. 研究結果

1. T-RFLP, クローンライブラリー法, そして培養法の検査結果を比較したところ、T-RFLPとクローンライブラリー法の結果は概ね一致した。これに対して、培養法で検出された菌種は他の2法で検出された主要な細菌種とは異なるものであった。また

T-RFLP解析とクローンライブラリー法で多種多様な口腔細菌叢が解明できたのに対して、培養法で検出された細菌種は数種に限定された。(図1)。

2. T-RFLP解析によって、移植後の口腔内細菌叢を構成する細菌種(遺伝子断片のピーク数)は減少する傾向にあることが明らかとなった(図2)。

3. T-RFLP解析に基づいた系統樹解析によって患者間、移植前後の細菌叢を比較検討した結果、細菌叢は抗生剤の投与の有無に関わらず、個体ごとに異なること、また移植前後での変化にも個体差が大きいことが分かった(図3)。

D. 考察

造血幹細胞移植患者の口腔内細菌叢は患者ごとにことなり、細菌検査の指標、あるいは標的となるような細菌種の同定には至らなかった。しかしながら、患者の口腔内細菌叢は易感染状態となる移植後に大きな変化を示すことから、日和見感染に対する注意の必要であることが、あらためて示唆された。また、培養法による検査では多様な口腔内細菌叢の解析が困難であることが示唆されたことから、分子生物学的手法を用いた個体ごとの細菌叢解析が口腔内感染状態の把握には必要であると考えられる。

E. 結論

院内感染に配慮した歯科治療を行うにあたって、口腔内の細菌叢を把握するためには、個体ごとに分子生物学的手法を用いた細菌検査法を応用することが有用である。

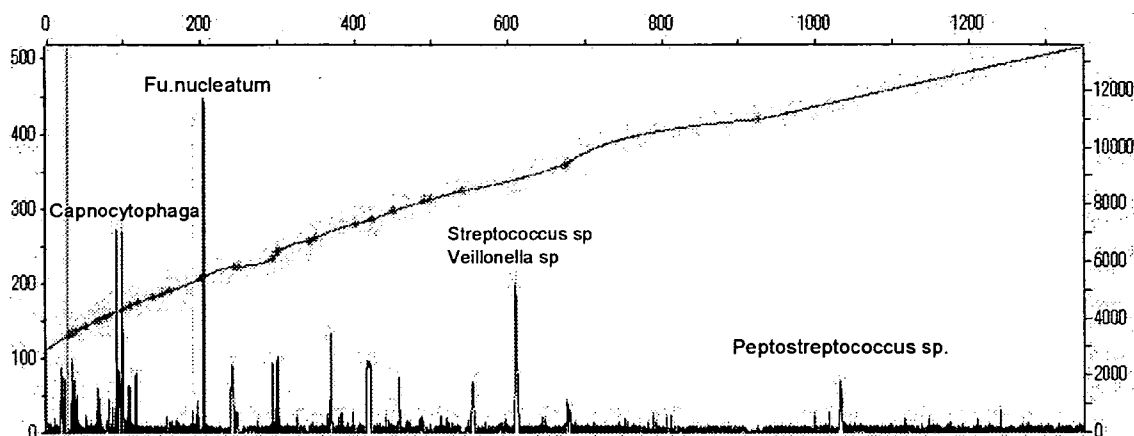


図1 T-RFLP 解析

造血幹細胞移植患者の移植1週間後の口腔内細菌叢の解析結果をT-RFLP解析の代表例として示す。横軸が断片長の大きさを、縦軸が蛍光強度を示す。16S rDNAのデータベースをもとに断片長から細菌種を推定することができる。また蛍光強度の強いピークは細菌叢のなかでの主要な細菌種であることが推定される。T-RFLP法とクローンライブラリー法（結果は示さず）による細菌叢の解析結果はほぼ一致するものであった。これに対して培養によって本サンプルから同定された細菌種は α -STREPTOCOCCUS SPP. ならびに NEISSERIA SPP. のみであった。

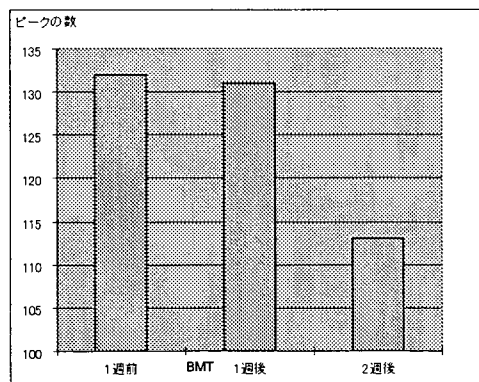


図2 T-RFLPの総検出断片数 (*MspI* 消化)

PCRで増幅した16S rDNA遺伝子断片は制限酵素 *MspI* で消化し、断片長解析した。検出された遺伝子断片のピーク数は造血幹細胞移植 (BMT) 後に大きく減少する傾向を示した。

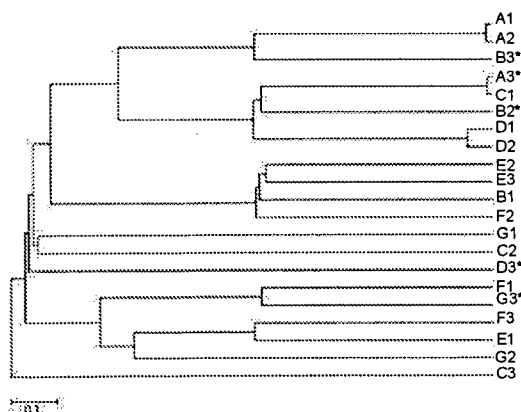


図1 口腔細菌叢の系統樹解析図

A-G: 患者, 1-3: 採取時期の異なるサンプル
* 抗生物質治療を受けている時期のサンプル

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Soga Y, Saito T, Nishimura F, Ishimaru F, Mineshiba J, Mineshiba F, Takaya H, Sato H, Kudo C, Kokeyuchi S, Fujii N, Tanimoto M, Takashiba S. Appearance of multidrug -resistant opportunistic bacteria on the gingival during leukemia treatment. J Periodontol 79: 181-186, 2008.

2) Sugiura Y, Soga Y, Tanimoto I, Kokeyuchi S, Nishide S, Kono K, Takahashi K, Fujii N, Ishimaru F, Tanimoto M, Yamabe K, Tsutani S, Nishimura F, Takashiba S. Antimicrobial effects of the saliva substitute, Oralbalance, against microorganisms from mucosa in the hematopoietic cell transplantation period. Support Care Cancer, in press.

2. 学会発表

1) 曾我賢彦, 杉浦裕子, 工藤値英子, 松浦香織, 久枝綾, 妹尾京子, 高柴正悟: 造血幹細胞移植患者の敗血症に口腔粘膜からの感染が関与する可能性の検討, 第7回 Okayama Hematology Conference, 2007/6/30.

2) 曾我賢彦, 工藤値英子, 松浦香織, 妹尾京子, 杉浦裕子, 苔口進, 新井英雄,

高柴正悟: 造血幹細胞移植中に抗生剤多剤耐性の日和見感染症起因菌が歯肉粘膜に増殖した症例, 日本歯周病学会 50周年記念大会, 2007/9/22.

3) Hassan Wael, 谷本一郎, 前田博史, 杉浦裕子, 曾我賢彦, 苔口進, 高柴正悟: 骨髓移植患者の口腔内細菌叢の変化 (Changes in the Oral Bacterial Microflora of Patients Receiving Bone Marrow Transplantation), 日本歯科保存学会 秋季学術大会(第127回), 2007/11/8.

H. 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（医療安全・医療技術評価総合）
分担研究報告書

院内感染の評価指標の細菌学的検証

—分子生物学的手法に基づく歯科給水系の細菌汚染状況調査—

分担研究者 苔口 進* 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授
研究協力者 渡辺朱理*、佐藤法仁*、前田博史**、高柴正悟**
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 *口腔微生物学分野、**歯周病態学分野

研究要旨

デンタルチェアユニットで使用されている水道水は配管内で停滞しやすく、バイオフィルム形成による細菌汚染が懸念されている。そこで、その給水系における細菌の状況を従来の培養法と細菌 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) を指標とした分子生物学的手法を用いて調査した。その結果、日常の診療終了時でも、Centers for Disease Control and Prevention (CDC; 米国疾病予防管理センター) が推奨する従属栄養細菌数 500CFU/mL 以下の基準に、給水系の 3 分の 2 が達していなかった。薬剤耐性遺伝子を Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で検査したところ、院内感染で問題となるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や多剤耐性緑膿菌は検出されなかった。また病原性の高いレジオネラ菌は検出されなかったが、デンタルチェアユニットの主な細菌種は *Novosphingobium* sp. であった。歯科診療室デンタルチェアユニット内における細菌汚染を防止するため、日々の診療開始前の通水や定期的な細菌検査が重要であると考えられる。

A. 研究目的

歯科医療用の水はデンタルチェアユニット配管内で滞留しやすく、バイオフィルム形成による細菌汚染が懸念されている。通常、水系に生息する細菌は長期間培養が必要で菌種同定が困難な従属栄養細菌や未知の細菌種が多い。そこで、某歯科診療室の 6 台のチェアユニット (スリーウェイシリンジ) および対照として手洗い場の給水栓 2 箇所の給水系における細菌の汚染状況をこれまでの培養方法に加えて、レジオネラ菌特異遺伝子や薬剤耐性遺伝子について Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で、さらに試料水の汚染細菌叢については新しい PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法で細菌 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) を指標とする分子生物学的手法を用いて調査することを目的とした。

B. 研究方法

1. 検査対象：給水系の水は、歯科診療室のデンタルチェアユニット (3WAY シリンジ) 6 台と手洗い場 2 ヶ所から、朝診療前と夕方診療後に採取した。

2. DNA 抽出：サンプルの DNA 抽出は InstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いて、各試料水を遠心沈殿した沈さから調製した。

3. 培養検査：細菌の培養は、普通寒天平板培地で 37°C、4 日間培養し、従属栄養細菌の培養は、American Public Health Association (APHA) が推奨する給水系細菌検査用 R2A 培地で 25°C、7 日間培養した。さらに、レジオネラ菌の WY0 α 培地を用いて、37°C、4~7 日間培養した。

4. 分子生物学的手法による調査：歯科給水系に生息する細菌叢は既報にしたがって PCR-DGGE 法で解析した。レジオネラ菌は培養検査と併せて PCR 法でレジオネラ特異遺伝子を検査した。さらに院内感染で問題となるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の *mecA* や多剤耐性緑膿菌の *bla*IMP および *bla*VIM さらに *bla*TEM 等の薬剤耐性遺伝子を PCR 法で検査した。

5. 細菌種の同定：16S rDNA 塩基配列で行なった。すなわち、菌種の同定や分類に

用いられる細菌 16S rDNA を PCR 法で増幅し、増幅 DNA 断片を TopoTA クローニングキット (Invitrogen) を用いてクローニングした。夫々の塩基配列を決定後、Web 上で公開されている細菌 DNA データベースと照合し、菌種を決定した。

C. 研究結果

日常の歯科診療終了時でも、CDC が推奨する従属栄養細菌数 500CFU/mL の基準に 3 分の 2 が達していなかった。給水停止によって生息細菌数は最大約 10 倍に増加した (図 1)。レジオネラ菌は検出されなかった。PCR-DGGE 法で分析した結果、いずれの給水系にも主に *Novosphingobium* 種が生息することが判明した (図 2)。PCR-DGGE 法は培養法に比べ、迅速に簡便に歯科医療給水系の細菌生息実態をパターン化、プロファイル化できた。今回、歯科医療給水系において調べた薬剤耐性遺伝子は検出されなかった。歯科医療給水系の細菌モニタリング調査にも分子生物学的手法は有用であった。

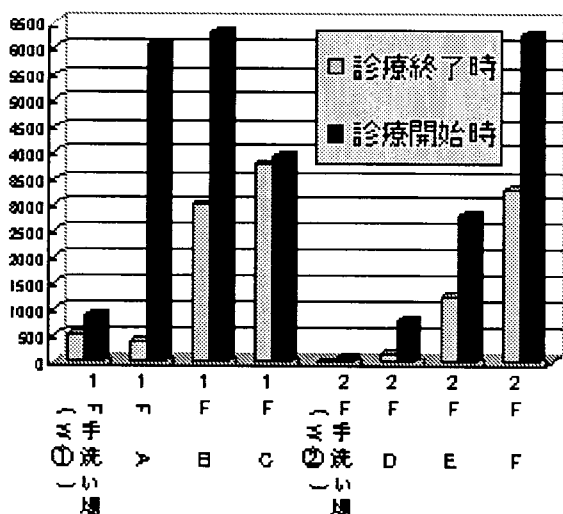


図 1. 培養法による細菌汚染状況調査

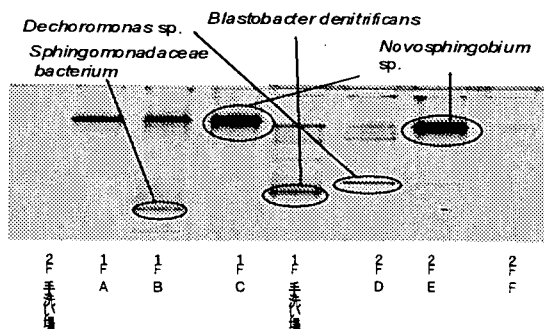


図 2. PCR-DGGE 法による細菌汚染状況調査

D. 考察

今回の調査でデンタルチェアユニット給水系の細菌汚染原因種として、*Novosphingobium* sp. や *Methylobacterium aquaticum* などが同定された。これらの菌は、歯科診療室デンタルチェアユニットのパイプ内でバイオフィルムを形成し、残留塩素などにも抵抗性を示すことが考えられる。

また、今回検出された細菌の病原性については、健康な人に対してはほとんど問題にならないが、抵抗力の弱い易感染性の患者には、感染の危険性があり、注意すべきであると考えられる。

今後も歯科給水系における細菌汚染状況や薬剤耐性菌の分布状況について分子生物学的手法を駆使してモニタリングしてゆきたい。

E. 結論

歯科診療室デンタルチェアユニット内においての細菌汚染を防止するため、日々の診療開始前の通水や定期的な細菌汚染検査が重要である。特に給水系の汚染細菌叢調査や院内感染対策で問題となるレジオネラ菌をはじめとする様々な病原細菌や薬剤耐性菌の検出には分子生物学的手法を利用した方法が有用であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugiura Y, Soga Y, Tanimoto I, Kokeyuchi S, Nishide S, Kono K, Takahashi K, Fujii N, Ishimaru F, Tanimoto M, Yamabe K, Tsutani S, Nishimura F, Takashiba S. : Antimicrobial effects of the saliva substitute, Oralbalance((R)), against microorganisms from oral mucosa in the hematopoietic cell transplantation

period. Support Care Cancer. (in press), 2008

Soga Y, Saito T, Nishimura F, Ishimaru F, Mineshiba J, Mineshiba F, Takaya H, Sato H, Kudo C, Kokeyuchi S, Fujii N, Tanimoto M, Takashiba S.: Appearance of multidrug-resistant opportunistic bacteria on the gingiva during leukemia treatment. J Periodontol. 79(1):181-6, 2008.

Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Yoshizawa S, Iwata H, Kokeyuchi S, Takashiba S, Nishimura F.: Macrophage-adipocyte interaction: marked interleukin-6 production by lipopolysaccharide. Obesity (Silver Spring). 15(11):2549-52, 2007.

Yamazaki K, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Kudoh C, Takashiba S, Kokeyuchi S, Nishimura F, Kodama M, Aizawa Y, Oda H. Relationship of periodontal infection to serum antibody levels to periodontopathic bacteria and inflammatory markers in periodontitis patients with coronary heart disease. Clin Exp Immunol. 149(3):445-52, 2007.

佐藤法仁、渡辺朱理、苔口 進、福井一博：歯科臨床実習生における感染制御専門資格および組織に関する認知度調査。INFECTION CONTROL 16 巻(6号), 94(588)-98(592), 2007.

佐藤法仁、渡辺朱理、苔口 進、福井一博：独立行政法人大学評価・学位授与機構における「学士(口腔保健学)」の新設について。日本歯科衛生学会雑誌 2 巻 1 号, 55-61, 2007.

渡辺朱理、佐藤法仁、苔口 進、福井一博：歯学科学生、歯科衛生士学校生、非医療系大学生における結核に対する意識調査。日本歯科衛生学会雑誌 2 巻 2 号, 印刷中, 2008.

前田博史、苔口 進、高柴正悟：Preventive Periodontology 臨床を支えるサイエンスを知る・唾液検査を活用する・生活習慣病を予防する(鴨井久一・花田信弘・佐藤勉・野村義明 編、医歯薬出版株式会社) 第 4 章 歯周病の発生因子(リスクファクター) 1-バイオフィルム-感染症の立場から(菌と菌のインターラクシオン) p.165-p.174, 2007.

2. 学会発表

第 50 回春季日本歯周病学会学術大会(神奈川県横須賀市, 横須賀芸術劇場ホ) 平成 19 年 5 月.

第 28 回岡山歯学会総会・学術大会(岡山市, 岡山大学 50 周年記念会館) 平成 19 年 8 月.

第 48 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会(札幌市, 北海道大学学術交流会館) 平成 19 年 8 月.

日本歯周病学会 50 周年記念大会(東京都千代田区, 東京国際フォーラム) 平成 19 年 9 月.

第 60 回日本細菌学会中国・四国支部総会(総社市, 岡山県立大学講堂) 平成 19 年 10 月.

日本歯科衛生士学会第 2 回学術大会(福岡市, 都久志会館) 平成 19 年 11 月.

日本歯科保存学会 2007 年度秋季学術大会(第 127 回) 第 9 回日韓歯科保存学会学術大会(岡山市, 岡山コンベンションセンター) 平成 19 年 11 月.

第 81 回日本細菌学会総会(京都市, 国立京都国際会館) 平成 20 年 3 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	頁
前田博史、苔口進、高柴正悟	第4章 歯周病の発生因子(リスクファクター) 1- バイオフィルム—感染症の立場から(菌と菌のインターラクション)	鴨井久一・花田信弘・佐藤勉・野村義明	Preventive Periodontology	医歯薬出版株式会社	東京	2007	165-174

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Ino T, Tada A, Tominaga A, Komori Y, Chiba H, and Senpuku H.	Role of salivary tumour necrosis factor α in HIV-positive patients with oral manifestations	International Journal of STD & AIDS	18	565-569	2007
Nakao R, Tashiro Y, Nomura N, Kosono S, Ochiai K, Yonezawa H, Watanabe H and Senpuku H.	Glycosylation of the OMP85 homolog of <i>Porphyromonas gingivalis</i> and its involvement in biofilm formation.	Biochemical and Biophysical Research Communications	365	784-789	2008
Kumada M, Senpuku H, Motegi M, Ryoma Nakao, Yonezawa H, Yamamura H, Watanabe H and Tagami J	Effects of <i>Enterococcus faecium</i> on <i>Streptococcus mutans</i> biofilm formation using flow cell system	Journal of Oral Biosciences	50	68-76	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
泉福英信	歯科医療機関における院内感染対策の導入について	日本歯科評論	774	135-140	2007
Mikuniya T, Kato Y, Ida T, Maebashi K, Monden K, Kariyama R, Kumon H	Treatment of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model.	J Infect Chemother	13	285-290	2007
狩山玲子、門田晃一、公文裕巳	緑膿菌性尿路感染症対策としての抗バイオフィルム剤探索とその基盤技術の開発	第41回緑膿菌感染症研究会講演記録	41	39-43	2007
渡辺豊彦、上原慎也、光畑律子、和田耕一郎、石井亜矢乃、狩山玲子、門田晃一、公文裕巳	尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィルム形成能と臨床的因子および薬剤感受性との関連性に関する検討	第41回緑膿菌感染症研究会講演記録	41	94-98	2007
野村佳代、大野勝雄、光畑律子、渡邊久美、犬飼昌子、狩山玲子、千田好子	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汚染状況の比較検討.	INFECTION CONTROL メディカ出版	16	86-90	2007
Soga Y, Saito T, Nishimura F, Ishimaru F, Mineshiba J, Mineshiba F, Takaya H, Sato H, Kudo C,	Appearance of multidrug-resistant opportunistic bacteria on the gingival during leukemia treatment.	J Periodontol	79	181-186	2008

Kokeyuchi S, Fujii N, Tanimoto M, Takashiba S.					
Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Yoshizawa S, Iwata H, Kokeyuchi S, Takashiba S, Nishimura F.	Macrophage-adipocyte interaction: marked interleukin-6 production by lipopolysaccharide.	Obesity	15	2549-52	2007
Yamazaki K, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Kudoh C, Takashiba S, Kokeyuchi S, Nishimura F, Kodama M, Aizawa Y, Oda H	Relationship of periodontal infection to serum antibody levels to periodontopathic bacteria and inflammatory markers in periodontitis patients with coronary heart disease	Clin Exp Immunol	149	445-452	2007
佐藤法仁、渡辺朱理、苔口 進、福井一博	歯科臨床実習生における感染制御専門資格および組織に関する認知度調査	INFECTION CONTROL	16	94 (588) -98 (592)	2007
佐藤法仁、渡辺朱理、苔口 進、福井一博	独立行政法人大学評価・学位授与機構における「学士（口腔保健学）」の新設について。日本歯科衛生学会雑誌 2 巻 1 号, 55-61, 2007.	日本歯科衛生学会雑誌	2	55-61	2007

IV. 研究成果の刊行物・別刷

バイオフィルム 感染症の立場から (菌と菌のインターアクション)

第4章 歯周病の発生病因

歯周病原因子の感染に起因する炎症性疾患である歯周病の発生病因について、関連する細菌種と病原因子、バイオフィルムの形成と構成細菌、バイオフィルムの生態と病原性から、バイオフィルムに対する今後のアプローチまでを考察する。

感染症としての歯周炎の特徴

歯周炎は歯肉縁下プラーク中のいわゆる歯周病原細菌の感染に起因する炎症性疾患である。感染症としての歯周病は、次のような特徴をもつ。

- ①口腔内常在菌を主体とした内因性感染である。
- ②多種多様な細菌種による混合感染であるが、*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* あるいは *Actinobacillus actinomycetemcomitans* などの特定の細菌種が病態に深く関与している。
- ③歯肉縁下の細菌群集（細菌叢）が形成するバイオフィルム（プラーク）感染症である。

内因性感染である歯周炎では細菌を完全に除去することが困難である。このため、歯肉縁下の細菌叢を量的ならびに質的にコントロールすることが治療の基本となる。すなわち、歯周病の細菌学的なリスクファクターである *P. gingivalis* や *A. actinomycetemcomitans* に代表される歯周病原細菌を歯周ポケット内から排除するとともに、総細菌量を可及的に減少させることが治療の成功につながる。ところが、実際の臨床の場ではこの感染のコントロールが非常に難しい。これは歯肉縁下の細菌群がバイオフィルムを形成しているためであり、歯周炎がバイオフィルム感染症と位置づけられる理由である。以下に、主要な歯周病原細菌種ならびに口腔バイオフィルムの性質について概説する。

歯周病原細菌種と病原因子

1. 歯周病原細菌の種類

歯周病の病原菌と考えられている細菌種は十数種類にも及ぶ。しかし、これらの細菌のいずれもが、いわゆる Koch の原則*1を満足しうようなものではない。歯周病の発症と進行のメカニズムには宿主の因子も大きく影響し、解明できていない点が多い。このため現段階では歯周炎局所、すなわち患者の歯肉縁下プラークから高頻度に検出される細菌種を歯周病原細菌としてとらえる考え方が定着している。

歯肉縁下プラークを構成する細菌は、グラム陰性の嫌気性桿菌が主体であり、スピロヘータ (*Treponema* 属) の割合も高い。すなわち、歯周病原細菌のほとんどはグラム陰性嫌気性桿菌、あるいは口腔スピロヘータに属する。歯周病の病型別にみても、慢性歯周炎については *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *Campylobacter*

*1 Koch (コッホ) の 4 原則：①病巣部に微生物が証明される。②菌を分離して純培養できる。③純培養した菌を動物に感染させた場合、同様の病的変化が起こる。④感染させた動物から同一の菌が分離される。現在では Koch の条件を満たさない感染症が多く、必ずしも病原体証明の必要条件とはされていない。

表 1 主要な歯周病原細菌種と病原因子

歯周病原細菌種	歯周病の病型	病原因子
<i>P. gingivalis</i>	慢性歯周炎 侵襲性歯周炎	トリブシン様酵素 (ジンジバイン), 線毛, コラゲナーゼ, 免疫グロブリン切断酵素, 活性酸素分解酵素, 莢膜など
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	慢性歯周炎 侵襲性歯周炎	LPS, 線毛, ロイコトキシン, 細胞膨化毒素, 莢膜など
<i>Treponema</i> 菌種	慢性歯周炎 壊死性潰瘍性 歯肉炎・歯周炎	トリブシン様酵素, 免疫抑制因子, デンティリジンなど
<i>T. forsythia</i>	慢性歯周炎	トリブシン様酵素など
<i>C. rectus</i>	慢性歯周炎	LPS, S-layer など
<i>F. nucleatum</i>	慢性歯周炎	LPS, 硫化物, 低級脂肪酸, レクチンなど
<i>E. corrodens</i>	慢性歯周炎	LPS, レクチンなど
<i>P. intermedia</i>	慢性歯周炎 思春期性歯肉炎 妊娠性歯肉炎 壊死性潰瘍性 歯肉炎・歯周炎	LPS, 莢膜, コラゲナーゼ, 免疫グロブリン切断酵素など

rectus, *Eikenella corrodens*, そして *Treponema* 属が, 侵襲性歯周炎については *P. gingivalis* と *A. actinomycetemcomitans* が, 思春期性あるいは妊娠性歯肉炎^{*2}に対しては *P. intermedia* が, 壊死性潰瘍性歯肉炎・歯周炎については *P. intermedia* ならびに *Treponema* 属が病原菌として支持されている (表 1). この他にも, *Capnocytophaga* 菌種あるいは *Selenomonas* 菌種などは高頻度に歯周病巣局所から検出される菌種であり, 歯周病への関与が強く示唆されている. これら歯周病原細菌のなかで *P. gingivalis*, *T. forsythia* と *T. denticola* は “red complex”^{*3}とよばれ, 3 菌種が同時に検出された場合には歯周炎のリスクが高いと考えられている. また, 近年の分子生物学的手法の進歩とこれを応用した細菌検査法の導入によって, これまで培養困難であった細菌種が歯周炎局所から検出・同定されるようになった. *Dialister* 菌種は分子生物学的手法によって歯周病巣から検出され, 病態への関与が示唆されている. 今後も新しい歯周病原細菌の候補が加わる可能性がある.

*2 妊娠性歯肉炎と *P. intermedia*: *P. intermedia* はエストロゲンやプロゲステロンなどの女性ホルモンによってその発育が促進される. このため, ホルモンの分泌量が多くなる思春期や妊娠時に歯肉溝内で増殖し, 思春期性歯肉炎や妊娠性歯肉炎発症の原因になると考えられている.

*3 red complex: Socransky らによって解析された, 歯肉縁下プラーク中において共存する頻度の高い細菌種の集合体 (complex). 5 つの主要な complex (red, orange, green, yellow, purple complex) がある. そのなかで red complex は歯周炎 (特に歯周ポケット深さとプロービング時出血) との関連性が高いと報告されている.

263-00565

2. 歯周病原細菌の病原因子

歯周病原細菌の保有する病原因子は、歯周病の発症と進行に大きく関与するだけでなく、動脈硬化症や糖尿病などの全身疾患を増悪させる因子にもなることが最近の研究で明らかになりつつある。グラム陰性菌に属するすべての歯周病原細菌は内毒素として LPS をもっている。LPS は宿主細胞に対して傷害的に作用し、炎症性サイトカインを誘導することで組織破壊や歯槽骨吸収を促進する。さらに、誘導された炎症性サイトカインは、糖尿病患者の血糖コントロールを悪化させることが知られている。表 1 に歯周病原細菌の保有する代表的な病原因子を示した。菌種特異的な病原因子をみると、*A. actinomycetemcomitans* は、多形核白血球やマクロファージに傷害を与える外毒素（白血球毒素；ロイコトキシン）を産生する。また、*T. denticola* は免疫抑制因子をもつため、本菌に対する抗体産生が起こり難いことが知られている。この他にも白血球の食作用に抵抗性を示す莢膜をもつ菌種や、コラゲナーゼあるいはトリプシン様酵素など組織破壊を誘導する酵素をもつ菌種が多い。なかでも *P. gingivalis* はジンジパイン*4とよばれる強力なトリプシン様酵素を保有している。ジンジパインはコラーゲンや免疫グロブリンを分解するだけでなく、補体を活性化して好中球を集積させる作用や、線毛形成あるいは赤血球凝集に関与して菌の付着を促進することも知られている。このため血中に移行した *P. gingivalis* が動脈硬化や心疾患の増悪因子となる場合、この酵素が重要な役割をもつと考えられている。

歯周病原細菌に特徴的で、忘れてはならない重要な病原因子として組織への定着能やバイオフィーム形成能がある。多くの歯周病原細菌は線毛やレクチンなどの付着因子をもち、歯周局所に定着する。また、付着能の弱いものは他の菌種と共凝集することでバイオフィーム形成に関与する。さらに、*P. gingivalis* や *A. actinomycetemcomitans*、あるいは *T. forsythia*、*T. denticola* などは宿主上皮細胞や血管内皮細胞に侵入できる能力があり、これによって歯周局所だけではなく、心・血管系疾患においても病原性を示すと考えられている。

バイオフィームを形成することで、歯周病原細菌は強固に歯周局所に定着する。また、抗生物質などの抗菌薬、あるいは宿主の免疫担当細胞はバイオフィーム中に容易には入り込むことができない。これによって歯周病原細菌は治療や宿主の免疫応答に抵抗性を示すようになる。このため、歯周治療を行う際にはプラークバイオフィームの性質を理解しておくことが大変重要である。

*4 ジンジパイン：システインプロテアーゼで、トリプシン様の酵素活性を示す。アルギニン残基を認識する Arg ジンジパイン (RGP) とリジン残基を認識する Lys ジンジパイン (KGP) の 2 種類がある。