

図5 自分の歯科診療所でHIV感染者の歯科治療を受け入れる意思がありますか

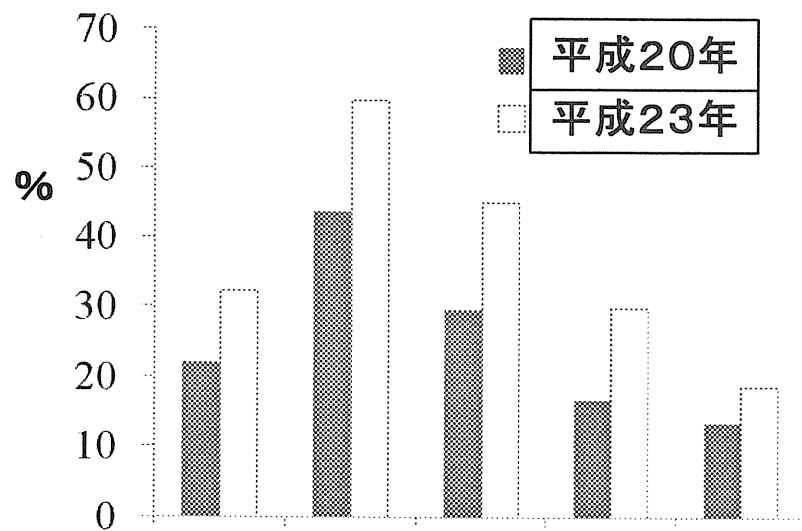


図6 HIV感染者の歯科治療を、自分の歯科診療所以外なら行う意思がありますか

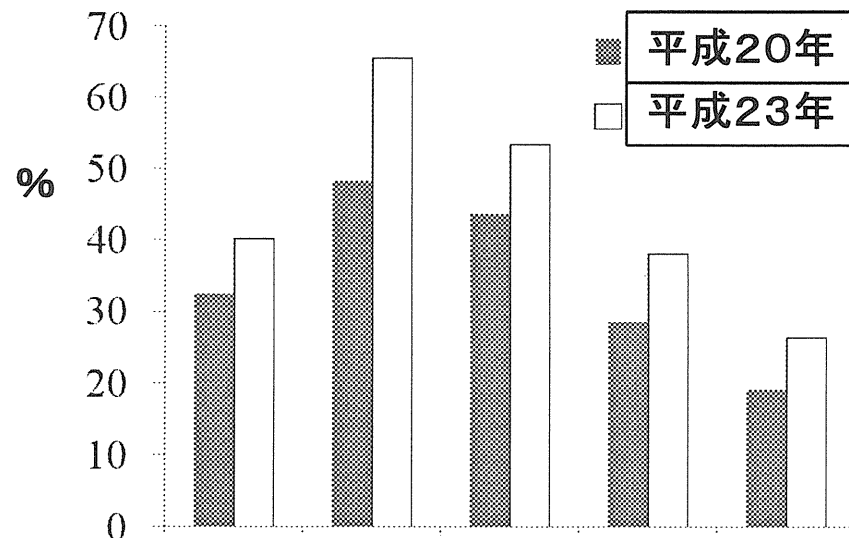


図7 過去3年以内にHIV感染者の歯科治療をしたことがありますか

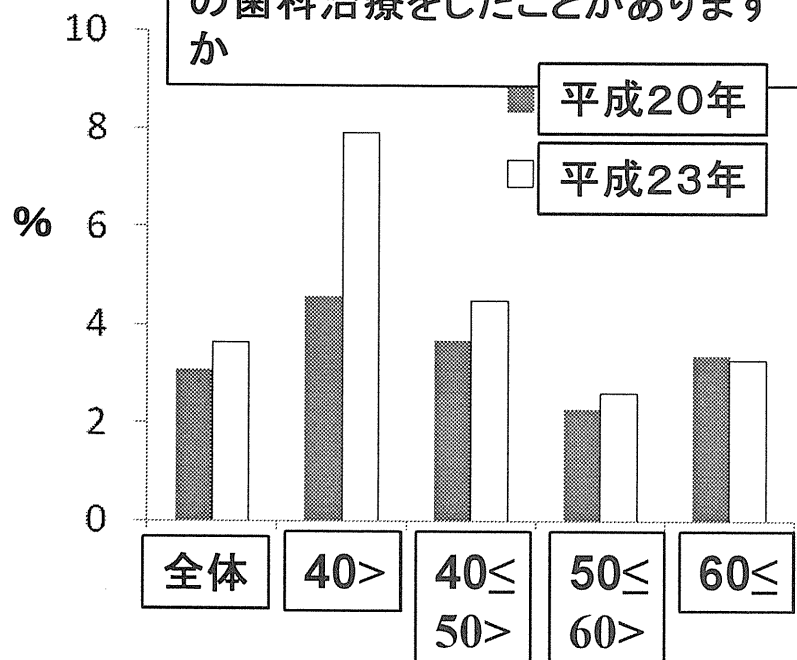


図8 HIV感染患者の歯科治療を拒否することはモラル的によくないと思いますか

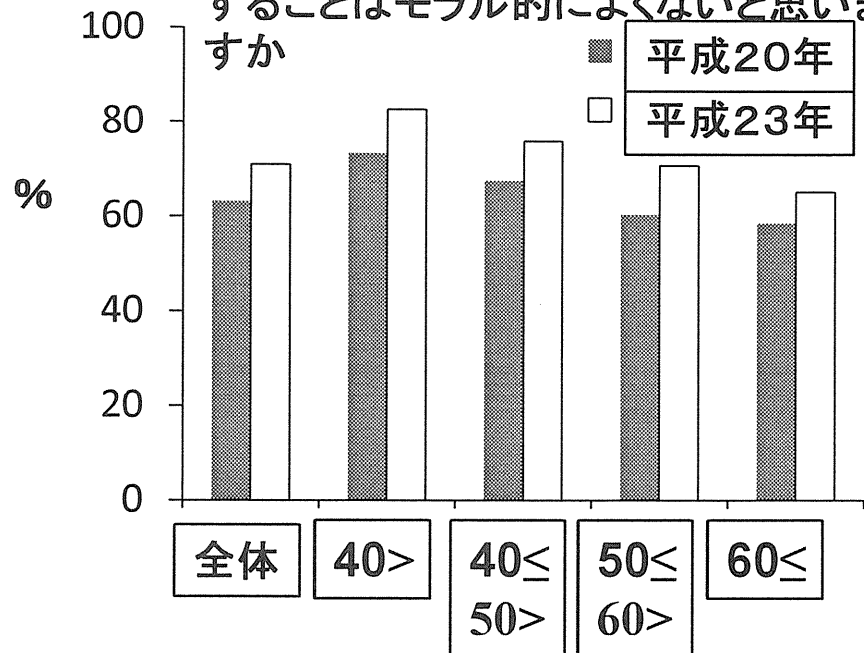


図9 HIV感染患者の歯科治療を自分の診療所で行うことにより、他の患者が来なくなる恐れがあると思いますか

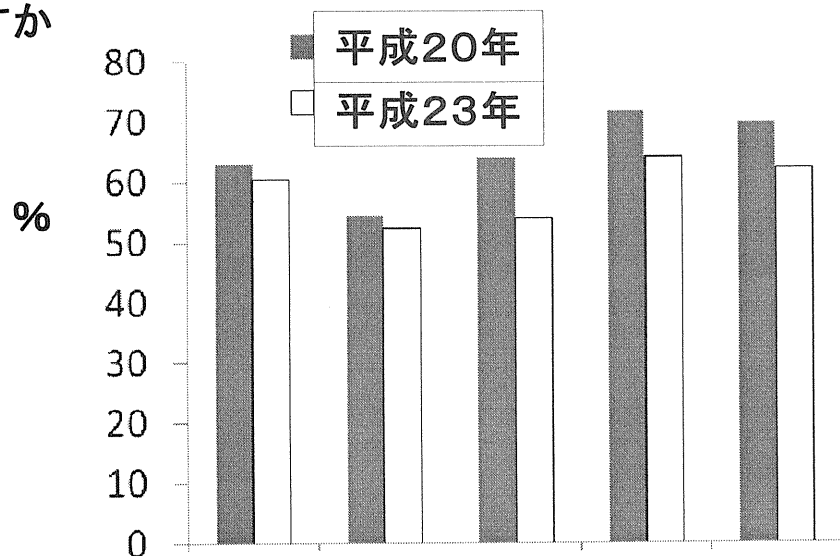


図10 「スタンダードプリコーションまたはユニバーサルプリコーション」とは何か知っていますか

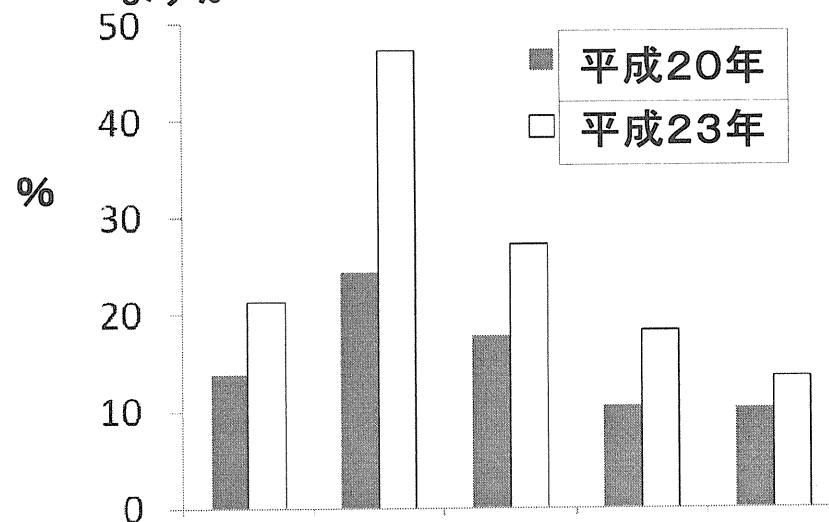


図11 HIV感染者に対するHAR RT療法を知っていますか

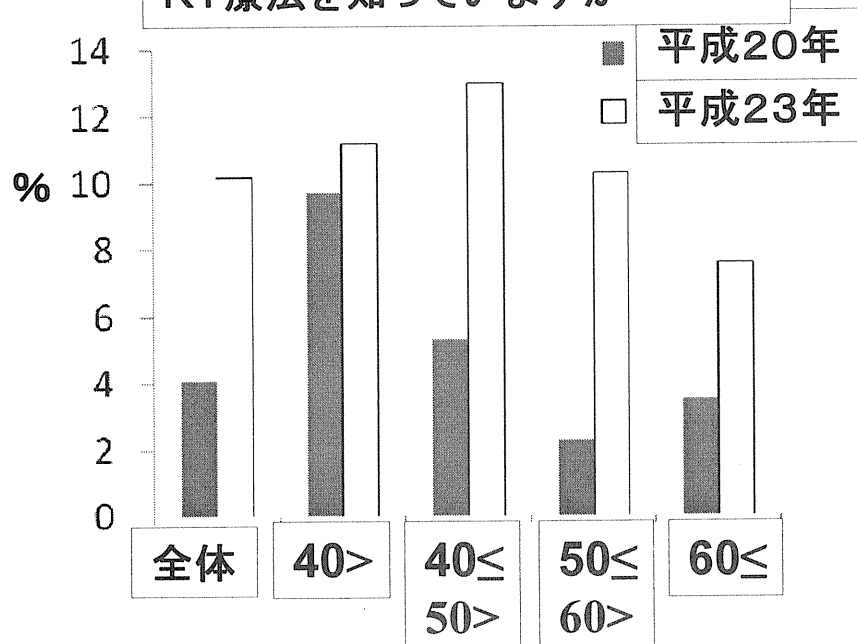


図12 防護用メガネを着用して診療していますか

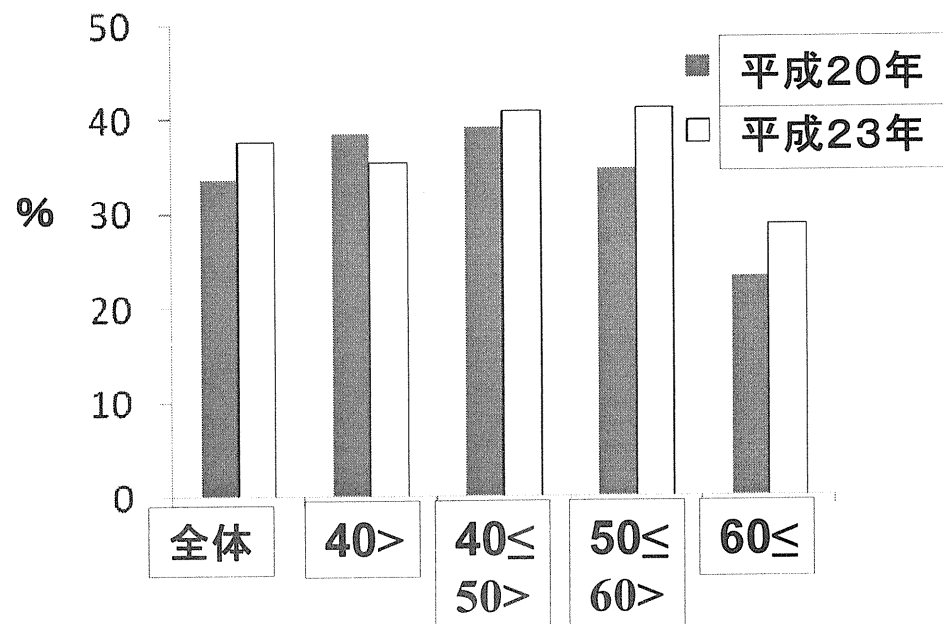


図13 グローブを着用して診療していますか
—必ずしている、

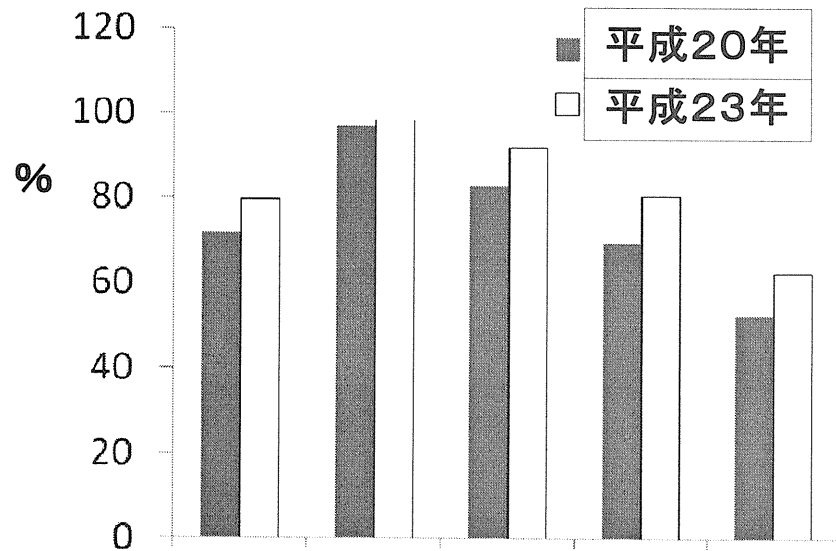


図14 患者ごとにハンドピースを交換していますか
—必ずしている

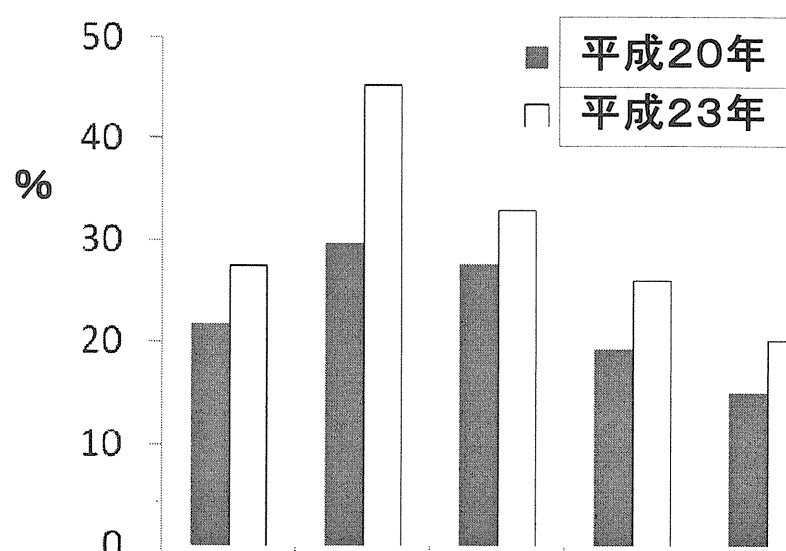


図15 感染対策に関しスタッフ教育していますか

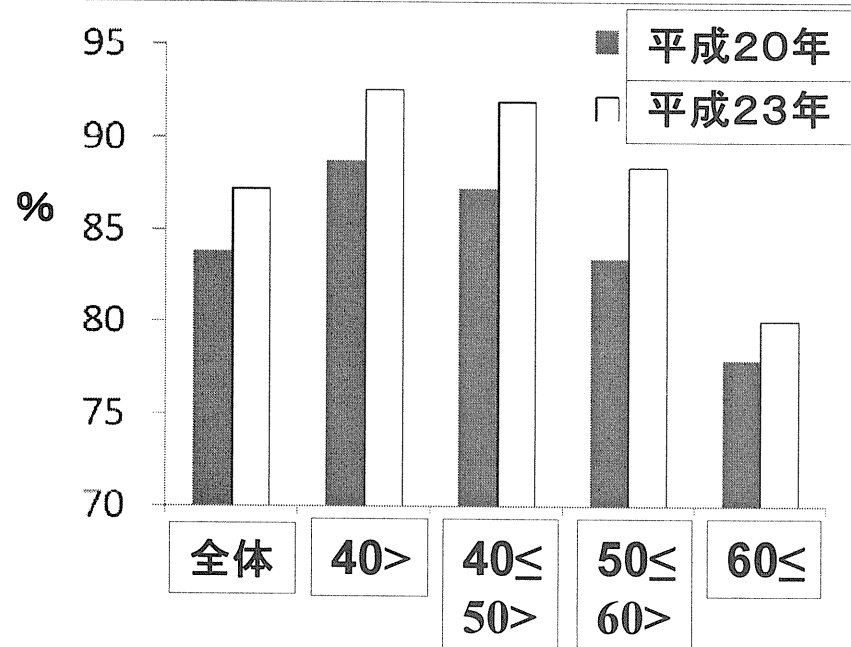


図16 感染対策マニュアルを作成していますか

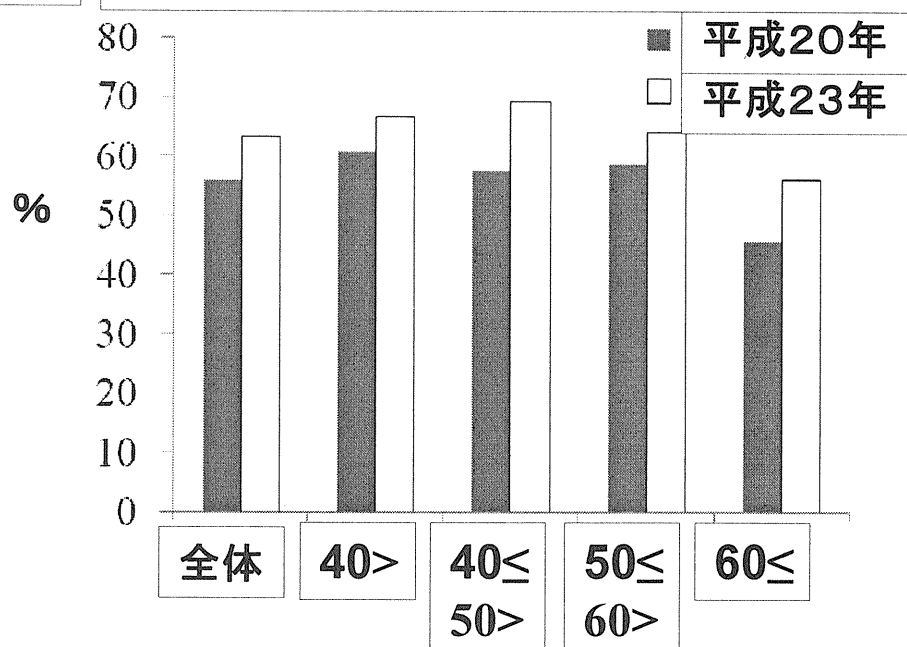


図17 感染予防対策の研修会に参加しましたか

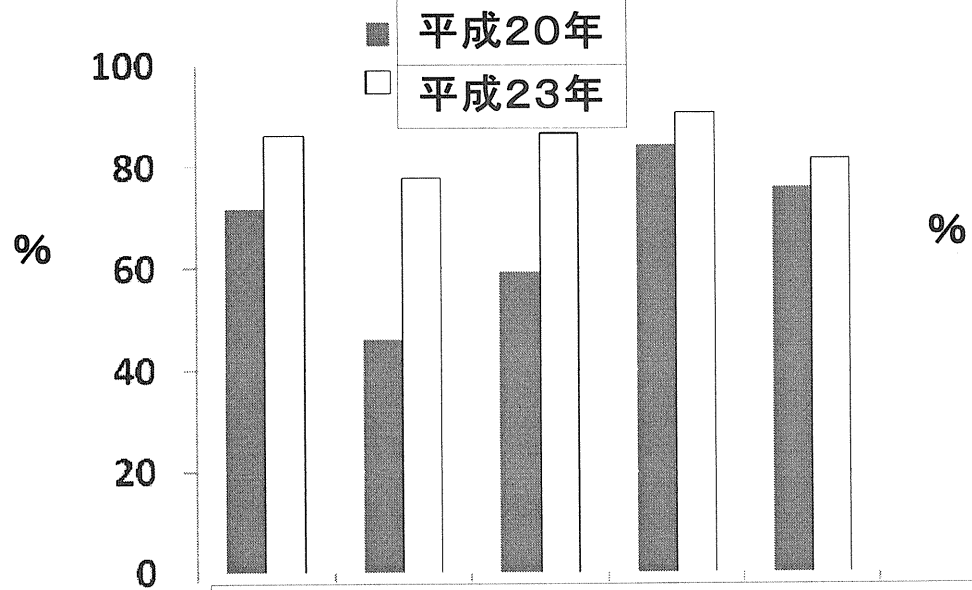


図18 スタッフにB型肝炎ワクチン接種を受けてさせていますか

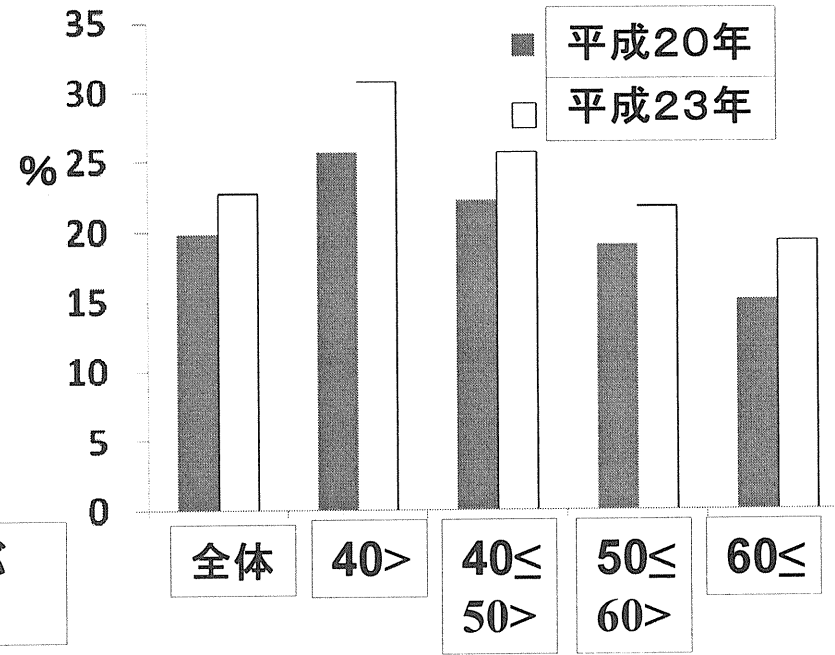


図19 自分の歯科医院内に口腔外バキュームを設置していますか

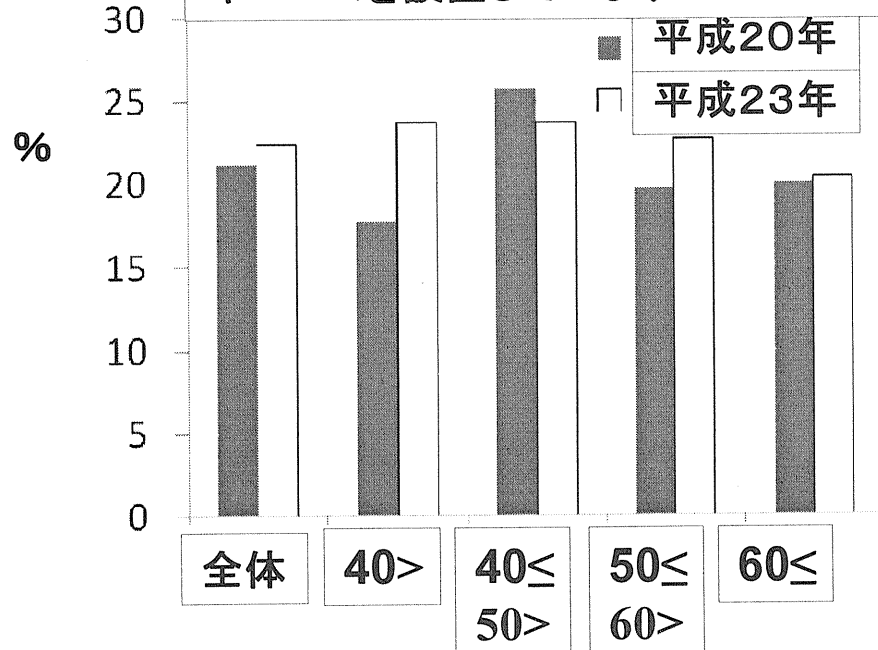


図20 スタンダードプレコーションを理解している人

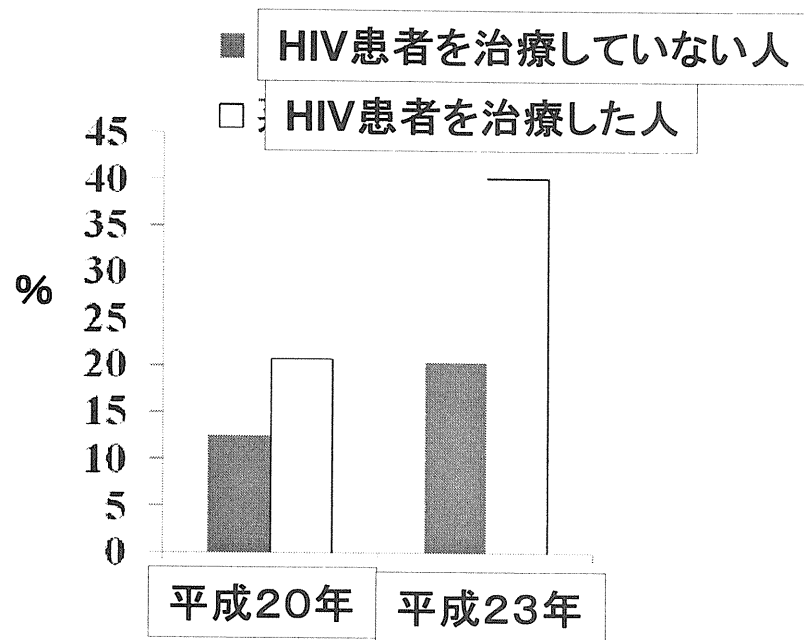


図21 HIV感染患者の歯科治療を拒否することはモラル的によくないと思う人

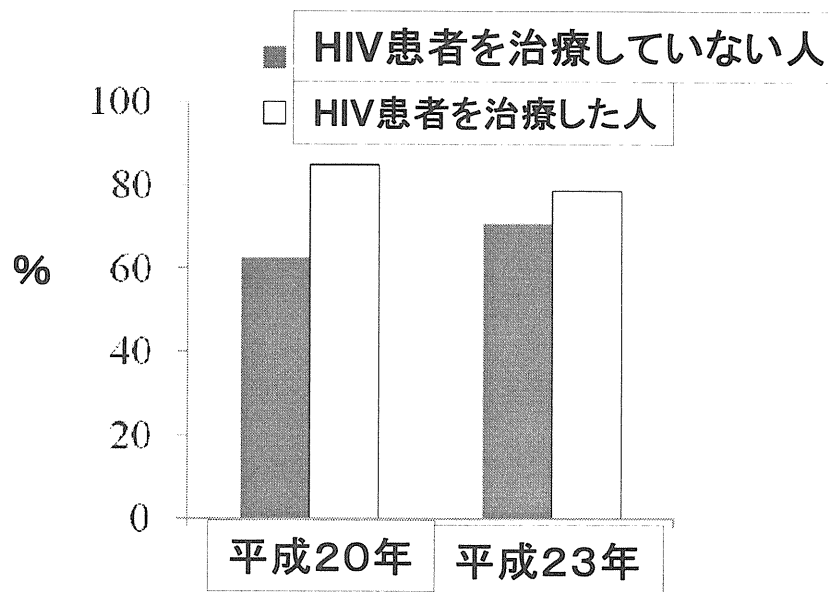


図22 HIV感染者に対するHARRT療法を知っている人

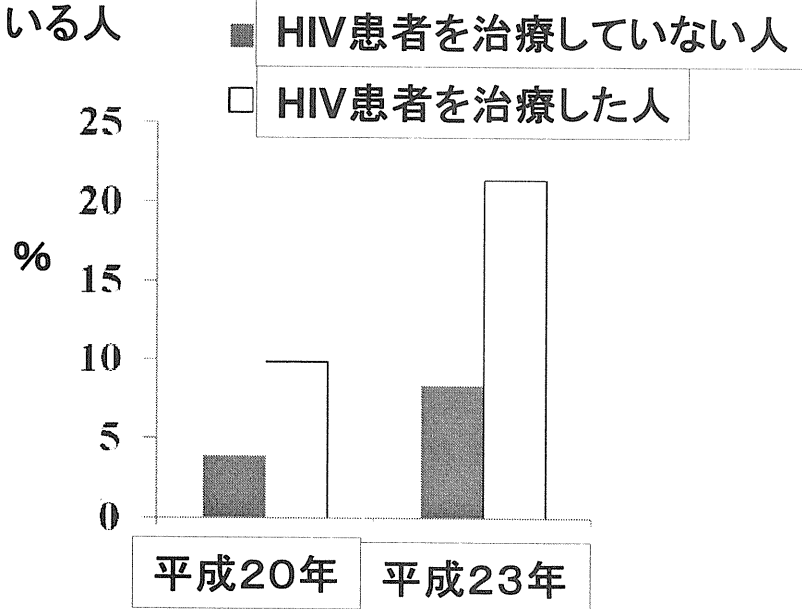


図23 防護用メガネを着用して診療していますか

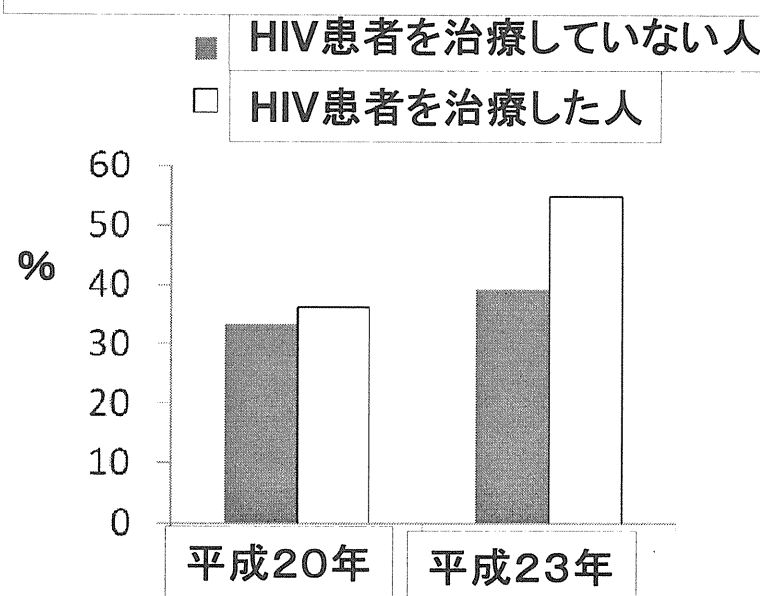


図24 患者ごとにハンドピースを交換している人

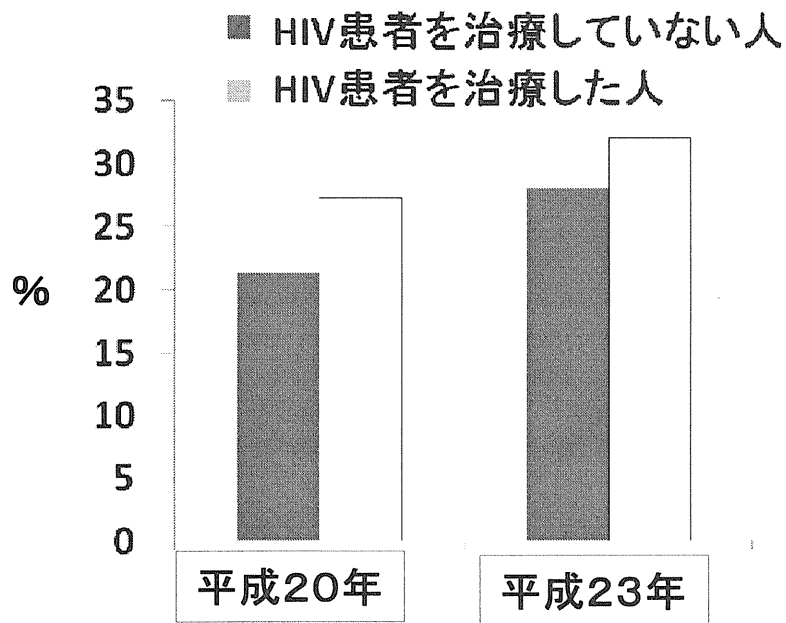


図25 手袋を着用して歯科治療している人

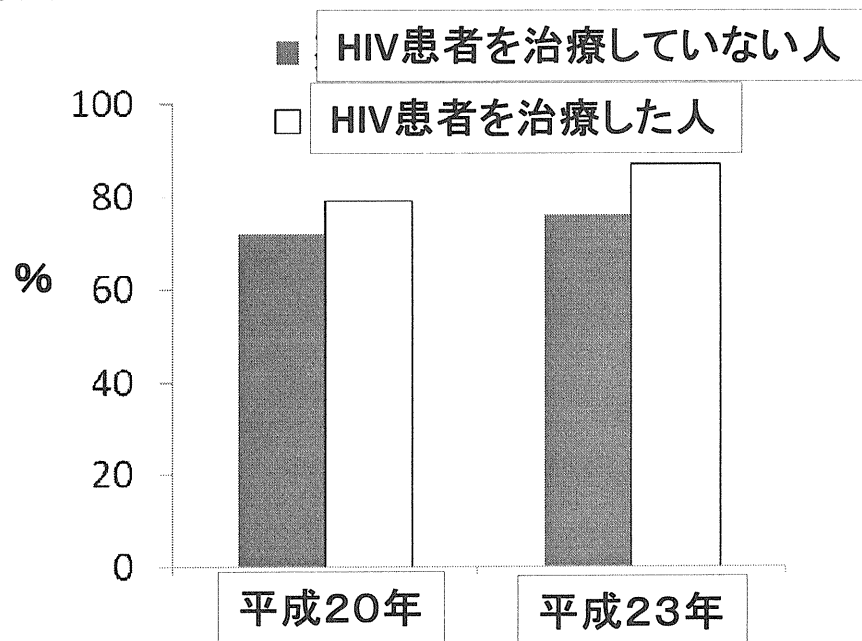


図26 感染予防対策の研修会に参加した人

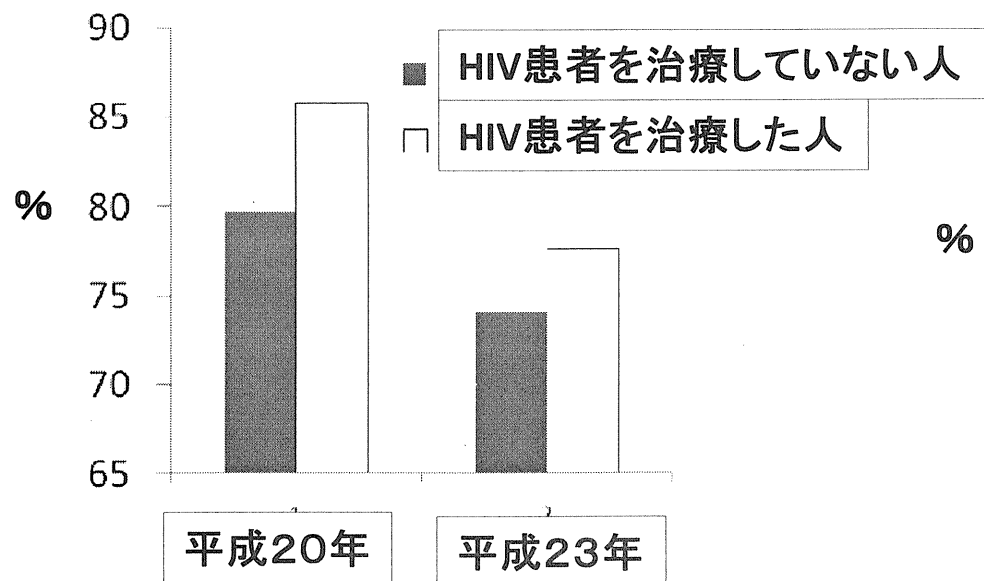


図27 B型肝炎ワクチンを接種した人

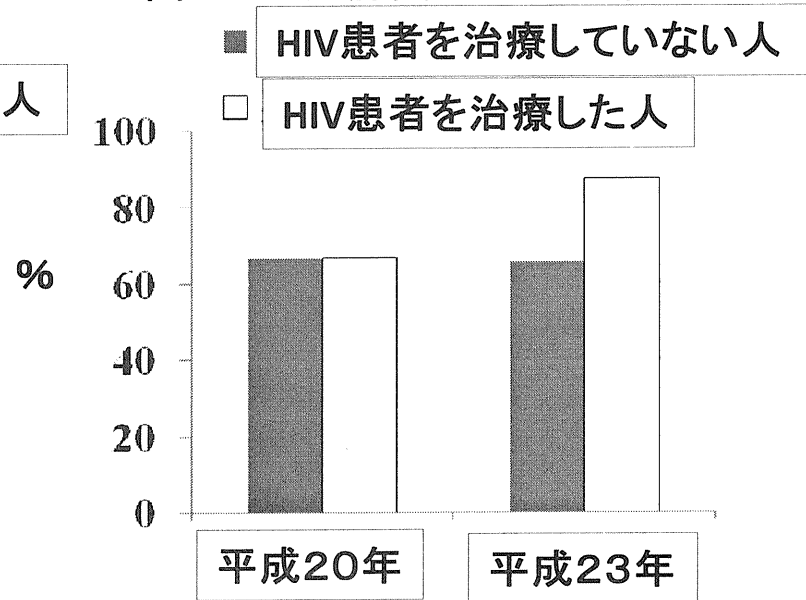


図28 スタッフへB型肝炎ワクチンを受けさせた人

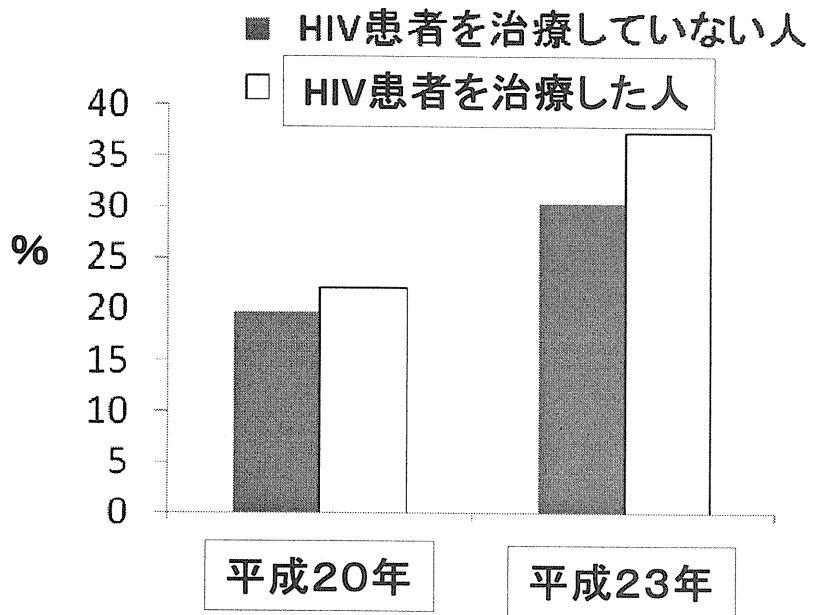


図29 自分の歯科医院内に口腔外バキュームを設置している人

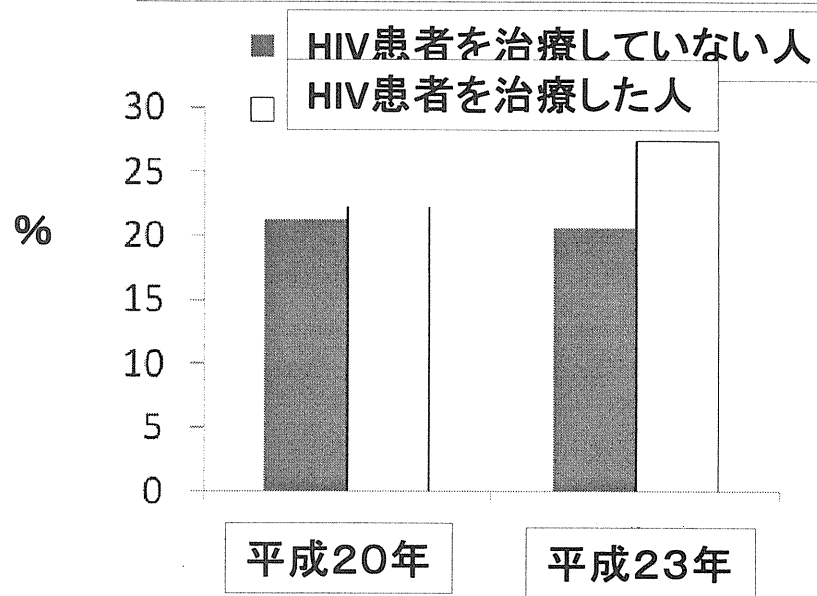
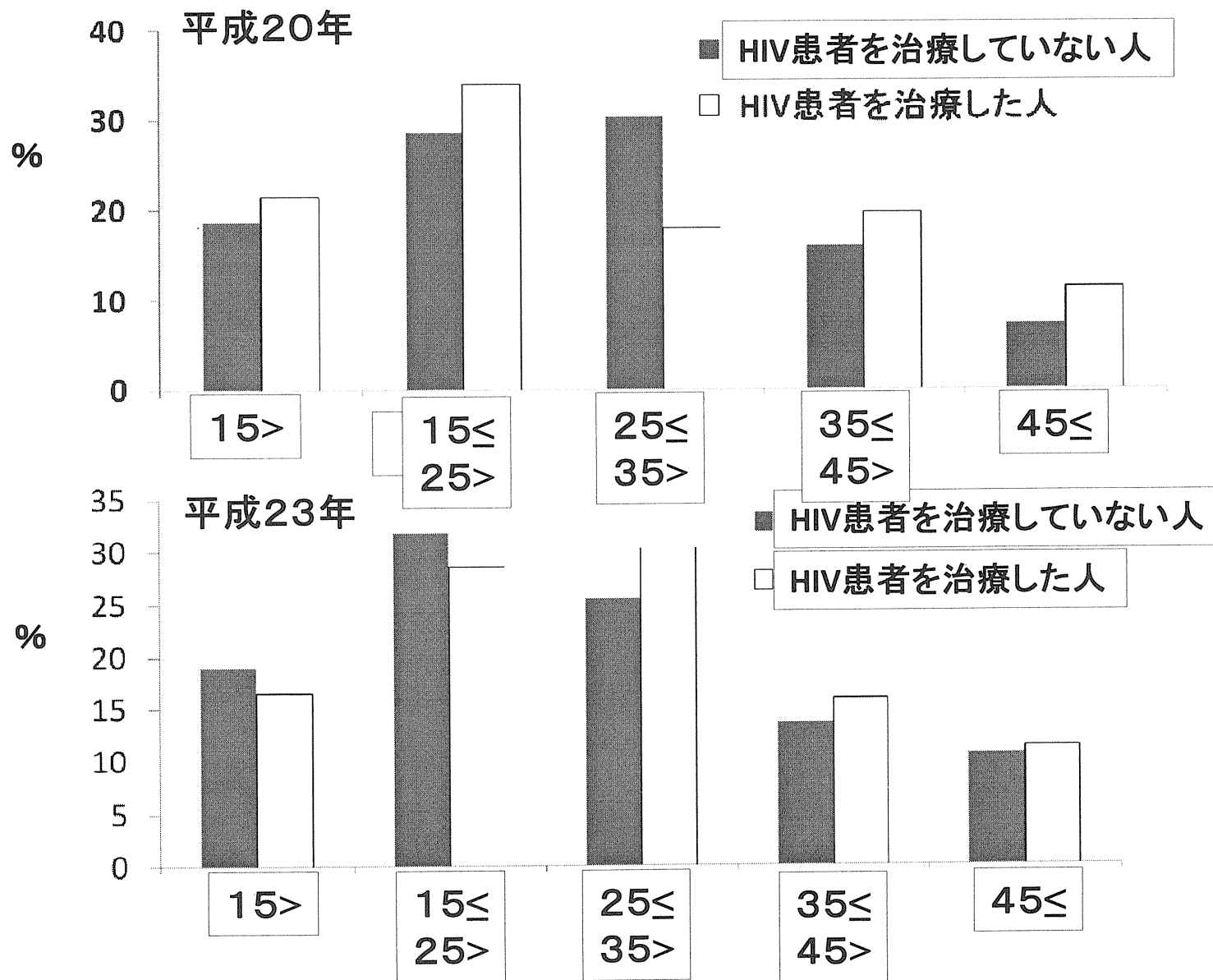


図30 一日の患者数



厚生労働省科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）
歯科医療における院内感染防止システム普及のための評価指標の標準化とその応用に
ついて

分担研究報告書

歯科用ユニット内微生物汚染除去システムを利用した院内感染防止システムの構築
給水汚染防止システムを取り入れたデンタルユニットの微生物汚染除去効果の検証

分担研究者：小澤寿子（鶴見大学歯学部・歯内療法学講座・講師）

協力研究者：長谷川（中野）雅子（鶴見大学歯学部・歯内療法学講座・助教）

高尾亜由子（鶴見大学歯学部・口腔細菌学講座・助教）

研究要旨

1993年より報告されている歯科用ユニットの給水管路（DUWL）のバイオフィーム形成と水汚染について、その汚染対策として、2008年に過酸化水素水を使用した新しい水回路クリーンシステム搭載の歯科用ユニットが開発された。鶴見大学歯学部附属病院に設置された新しい歯科用チェアユニットに装備されたクリーンシステム、また2010年に微酸性電解水の生成装置を搭載し、DUWLに微酸性電解水を流入して診療に使用する別の試作開発した歯科用ユニットの有効性について、昨年度に引き続き評価した。

2種類の歯科用チェアユニットは日常的に歯科診療に使用し、定期的にハイスピードハンドピース部、コップ給水等から水サンプルを採取し、残留塩素濃度測定、微生物学的分析を行なった。その結果、これらの新クリーンシステムはDUWLの水の汚染対策として有効であることが示唆された。

また、歯科用ユニット水回路より分離した従属栄養細菌に対する微酸性電解水の殺菌効果について、浮遊菌とバイオフィームに対して検討を行なった。その結果、従属栄養細菌の種類により殺菌効果は異なっていた。また浮遊菌に対する有効性が認められたため、バイオフィーム抑制効果は期待できるが、すでに形成されたバイオフィームに対し微酸性電解水を多量に用いることが重要であることがわかった。微酸性電解水の金属に対する劣化・腐食性を調べるため、金属溶出試験を行なったところ、水道法に定められる水質基準値以内であった。

A. 研究目的

歯科用チェアユニットのタービン、シリンジなどを通して排出される水の汚染度は高く $10^4 \sim 10^7$ CFU/mlに達すると報告されている。その微生物の大部分は一般的な従属栄養性水生細菌であるが、易感染性宿主では日和見感染症を起す可能性のある *Pseudomonas*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Candida* なども検出されている。そのため、汚染水から起こ

る疾患のリスクは、高齢者、幼児、そして免疫不全性疾患患者で高くなり、また心疾患患者にも注意が必要である。

DUWLにおいては、①直径が小さく、流量に相対して表面積が大きい、②チューブ内の水には、高圧がかからない、③水流の速度が壁近くでは遅い、という問題点がある。チューブ内の水流は、中央では流れが最も速いが外側にいくにつれて遅くなり、チューブの内

壁付近では流速は0に近くなってバイオフィルム形成が起こるといった問題点がある。すなわち、流入する水の中には微生物が少なくても、持続的に存在するとバイオフィルム形成の原因となり、その中を水が流れるのでバイオフィルムから微生物を巻き込んだ汚染水として流出する。

DUWL の汚染対策の基準として、米国の American Dental Association では歯科用ユニット水の水質基準を従属栄養細菌で 200 CFU/ml とし、米国疾病対策センターCenters for Disease Control & Prevention (CDC) では、非外科的処置の場合、米国の飲料水の水質基準従属栄養細菌 500 CFU/ml 以下を推奨している。また、骨削除など外科的処置時には、滅菌水を使用することを提示している。しかしながら、日本では歯科用ユニット水の水質基準は提示されていないのが現状である。

DUWL 汚染対策として 2008 年試作された H₂O₂ 希釈液 (1000 ppm) による自動洗浄装置を組み込んだ歯科用チェアユニットの新クリーンシステムの有効性について、さらに微酸性電解水の生成供給装置を組み込んだ歯科用チェアユニットでその有効性について、引き続き評価した。また、微酸性電解水の生成供給装置を組み込んだ歯科用チェアユニット DUWL から分離された微生物を同定し、その浮遊菌およびバイオフィルムに対して、今回は微酸性電解水の殺菌効果を検討した。

B. 研究方法

1) H₂O₂ 希釈液 (1000 ppm) による自動洗浄装置を組み込んだシステム (2008 年 11 月より鶴見大学歯学部附属病院保存科診療室に設置した歯科用チェアユニット: スペースライン™ イムシアⅢ型, (株)モリタ社) の評価
毎日の診療後に備え付けのタンクに入った

H₂O₂ 希釈液 (1000 ppm) をハイスピードハンドピース: H-1, ロースピードハンドピース, 3way シリンジ, 超音波機器: US, コップ給水の DUWL 内に流して洗浄後、夜間および休日中滞留させ、翌日以降、診療開始前に残留水排出用フラッシング装置を使用して、H₂O₂ を排出して水道水に入れ替え、診療中は水道水を使用する。H₂O₂ の供給と排出、水道水への入れ替えは、コックとボタン操作により自動的に行うことができる。他のハイスピードハンドピース回路 (H-2) には別管路から水道水を供給し、毎朝診療前にフラッシングを行った。また、2 本のハイスピードハンドピースの稼働時間は積算タイマー記録を目安に均等になるように使用した。

毎月 1 回診療後、H-1, H-2, コップ給水, ユニット給水元から流出する水を滅菌容器に採取して、残留塩素濃度を測定後、R2A 寒天培地上で 25°C, 7 日間培養後にコロニー数を測定した。同時に標準寒天培地上で 37°C, 48 時間の培養を行った。

2) 微酸性電解水の生成供給装置を組み込んだシステム (2010 年 7 月より鶴見大学歯学部附属病院保存科診療室に設置した歯科用チェアユニット: スペースライン™ イムシアⅢ型, (株)モリタ社) の評価

生成供給装置から微酸性電解水 (有効塩素濃度 10~30ppm, pH6.3~6.8) を DUWL (ハイスピードハンドピース: H-1, ロースピードハンドピース, 3way シリンジ, 超音波機器: US, コップ給水) に常時供給できる。DUWL には、水道水対応の場合と異なる化学的変化の生じにくい部材を使用している。他のハイスピードハンドピース回路 (H-2) には別管路から水道水を供給し、毎朝診療前にフラッシングを行った。また、2 本のハイスピードハンドピ

一スの稼動時間は積算タイマー記録を目安に均等になるように使用した。

鶴見大学歯学部倫理審査委員会の審査、承認を得て2010年7月本学附属病院に設置し診療に使用した。また患者に対しては、診療前にシステムおよび微酸性電解水について説明し承諾書への署名を得た後に使用した。診療後、微酸性電解水についてアンケート調査を実施した。

毎月1回診療開始前、H-1、H-2（フラッシング前後）、コップ給水、ユニット給水元から流出する水を滅菌容器に採取して、残留塩素濃度を測定後、R2A寒天培地上で、25°C、7日間培養後にコロニー数を測定した。同時に標準寒天培地上で37°C、48時間の培養を行った。

3) DUWL より分離された優勢菌種の同定

微酸性電解水の生成供給装置を組み込んだ歯科用チェアユニット DUWL より分離された優勢菌種の発育コロニーに対して、PCR法により16S rDNAの塩基配列解析を行った。

4) DUWL からの分離菌に対する微酸性電解水の殺菌効果

微酸性電解水の生成供給装置を組み込んだ歯科用チェアユニットの水道水使用のハイスピードハンドピース（H-2）排出水より分離された優勢菌 10^7 CFU/mlに微酸性電解水を接触（0、15、30秒）後に0.5%チオ硫酸ナトリウム液で中和後、R2A寒天培地上で25°C、7日間培養しコロニー数を算定した。

さらに分離菌を96穴平底マルチプレートに接種、25°Cにて3、5日培養後のバイオフィルム状態の菌に、PBSにて洗浄後、微酸性電解水を作用させ、反応時間後に0.5%チオ硫酸ナトリウムにて反応を停止させ、再びPBSにて洗浄し、

マルチプレートリーダー（Multiskan[®]; Labsystems）により微酸性電解水を作用する前後の吸光度（OD_{620nm}）を測定した。さらにPBSを除去後、Alamar Blue（Invitrogen）とR2Aの混合液を各ウェルに添加し、微酸性電解水を作用後の微生物の代謝活性を、室温における蛍光強度（励起波長：530nm、蛍光検出波長：590nm）の経時変化としてマイクロプレートリーダー（CYTOFLUOR II, PerSeptive Biosystems）にて測定した。

5) 金属溶出試験

2011年1月と12月に水道法に定められた方法で、鉛、六価クロム、亜鉛、銅についての金属溶出試験を日本食品分析センターに依頼して行なった。

C. 結果

1) H₂O₂希釈液（1000 ppm）による自動洗浄装置を組み込んだシステムについて

残留塩素濃度は、4ヶ月目より、H-2の残留塩素濃度は0.10～0.37 ppmに低下し、H-1、コップ給水との相違が認められた。14～20ヶ月目の間、H-1、H-2、コップ給水の残留塩素濃度の値は混在していた。21ヶ月以降、H-2の残留塩素濃度は、24ヶ月目にコップ給水よりわずかに高かったが、H-1の残留塩素濃度（0.64～0.77 ppm）より低く、0.06～0.71 ppmであった。一方、ユニット給水元から採取した水の残留塩素濃度はH-1、H-2、コップ給水よりも高い値を示した。

H₂O₂による洗浄が行われているコップ給水に水の汚染は認められなかった。また同様に、H-1では10ヶ月後までは汚染は認められなかったが、11ヶ月以降少量のコロニーが観察された。またカップリング部の汚染が認められた21ヶ月後に 1.1×10^3 CFU/mlが検出されたが、カップリング除去後の水質検査では検出限界以下

となった。

一方、洗浄システムから分離したH-2では、残留塩素濃度の低下が認められた。4か月以降、微生物のコロニーが検出されはじめ、H-1との相違が認められたが20ヶ月までは 3.7×10^2 CFU/ml以下であった。その後、H-1と同様にカップリング部の汚染が認められたため、カップリング部のH₂O₂消毒用アルコール清拭消毒を行ったところ、汚染は減少したが、定期的なカップリング部の清拭消毒が必要ながわかった。

いずれの場合も同時に標準寒天培地上で37°C、48時間の培養を行った結果では、一般細菌は検出されなかった。

2) 微酸性電解水の生成供給装置を組み込んだシステムについて

17ヶ月間、微酸性電解水を使用した管路からは10~30ppm間で水道水に比べ高い塩素濃度を維持していた。H-1、US、コップ給水、給水元からはコロニー発育は認められなかった。一方、H-2からはフラッシング後10~440cfu/mlのコロニーが認められた。

引き続き患者へのアンケート調査の結果、水の目的や効力・安全性について理解を得られていた。また微酸性水について、臭い・味・色が気になるという意見はほとんどなく、今後の使用について否定的な感想は見られなかった。

3) DUWLより分離された優勢菌種の同定結果

塩基配列解析した優勢菌種は、*Sphingomonas spp.*、*Mycobacterium spp.*、*Methylobacterium spp.*であった。

4) DUWLからの分離菌に対する微酸性電解水の殺菌効果

微生物の種類によって感受性が異なり、15秒の微酸性電解水との接触で *Sphingomonas spp.* と *Methylobacterium spp.* は検出限界以下となったのに対し、*Mycobacterium spp.* は1%弱の生菌が残存した。

バイフィلمに対しては、全ての菌で微酸性電解水処理での代謝活性が低下したが、電解水の交換を行なった場合に効果が大きかった。しかしながら、水で処理したコントロールに比べて、*Methylobacterium spp.* は3%の生菌が残存、*Sphingomonas spp.* は5%の生菌が残存し、*Mycobacteriu. spp.* では0%で水処理より代謝活性は低下していた。

5) 金属溶出試験

いずれの採取部位においても鉛、六価クロム、亜鉛、銅の金属溶出は水道法に定められる水質基準値以内であった。

D. 考察

H₂O₂をDUWL洗浄に選択した理由は、人体に対する安全性が比較的高く生物体以外の表面では殺菌消毒効果が持続し、管路の部材に対する腐食性が少ないためである。

カップリング内部の特に給水管路など水が滞留する部分からの汚染があったと考えられるため、カップリング部はハンドピース未装着時には専用キャップを装着し、カップリング部の定期的洗浄消毒が必要ながわかった。

洗浄システムから分離し、通常どおり水道水のみを使用しているH-2では、残留塩素濃度の低下が認められた4ヶ月以降、微生物のコロニーが検出されはじめ、H-1との相違が認められた。しかしながら、診療後の水質検査で微生物が検出されたH-2においても、始業前のフラッシング後には、米国CDCの推奨する500 CFU/ml

以下であったため、フラッシング後にH-2の水を使用することには問題がないと考えて日常臨床に使用している。

塩基配列解析の結果、優勢菌種は主に土壌など自然界に分布している従属栄養細菌の種類であった。従属栄養細菌は上水道にも含まれ、低栄養環境で体温より低い温度で生育しやすい。日本の水道水の水質基準の目標設定項目として、従属栄養細菌 2000 CFU/ml 以下（暫定）と提示されている。R2A 培地は、飲用水の従属栄養細菌の培養用に開発され、酵母エキスやカゼインペプトン量が標準寒天培地の5分の1であり、水道法の水質管理目標でも使用が指示されている培地であるため今回使用した。

微酸性電解水を使用した管路からは 10～30ppm で水道水に比べ高い塩素濃度を維持していた。今回、土曜・日曜と2日間ユニットを使用していないという環境におかれた後に採取したが、これまで同管路からは微生物は検出限界以下で、微酸性水の DUWL の汚染防止、管路内のバイオフィーム形成の阻止、抑制に効果があることが示唆された。一方、システムから分離した水道水を使用している H-2 はフラッシングによる効果は認められたが、H-2 からは従属栄養細菌と考えられる微生物が検出され DUWL との相違が認められた。以上のことより、本システムは DUWL の感染予防に対して、有効であると考えられる。本ユニットを使用した患者から微酸性電解水使用に対して良好な評価を得られたことから、今後、使用期間をさらに延ばし、微酸性電解水の殺菌効果等の微生物学的検討を続けていく予定である。またユニットへの劣化、腐食評価などを行い、本システムの有効性を継続して評価し、さらにユニット部材質や使用機材についても検討していくことが必要であるが、現段階で

は DUWL 水への金属溶出はなく、機能的な障害は認められていない。しかし、本チェアユニットは微酸性電解水使用に耐えうる部材に改良されており、一般に市販されているチェアユニットの DUWL は水道水を流すことを前提とした部材が使用されているため、微酸性電解水を流すと腐食しやすく、金属溶出や機能的な不具合の発生が懸念される。使用されている部材は、メーカーによっても多種多様であるため、微酸性電解水を応用する際には、事前の入念な調査と使用中の管理が重要である。

微酸性電解水は、DUWL から分離された浮遊状態の従属栄養細菌に対して短時間で顕著な殺菌効果を示したが、菌種による相違が認められた。またバイオフィーム状態の微生物に対しては、微酸性電解水は多量に用いることが重要であることがわかった。DUWL への微生物汚染対策として、微酸性電解水の特徴を生かした消毒、洗浄方法について、さらに検討する必要がある。

E. 結論

1. H₂O₂ 使用したクリーンシステムは 37 ヶ月間、微酸性電解水を使用したクリーンシステムは、17 か月間、DUWL 水の汚染対策としての有効性が保たれていた。

2. 微酸性電解水は浮遊状態の従属栄養細菌に対して殺菌効果を示したが、菌種による相違が認められた。バイオフィームに対して、全ての菌で微酸性電解水処理での代謝活性が低下したが、電解水の交換を行なった場合に効果が大きかった。

3. 微酸性電解水使用の DUWL 水への金属の溶出はいずれの採取部位においても水道法に定められる水質基準値以内であり、微酸性電解水の金属に対する劣化・腐食性は少ないこと

がわかった。

F. 研究発表

論文

1. 歯科用ユニット給水管路の新クリーンシステムの評価、小澤寿子、中野雅子、木村泰子、新井 高、日本歯科保存学雑誌 54 (3) 193-200, 2011.

学会発表

1. 歯科診療用水回路の汚染対策、池野正典、中野雅子、小澤寿子、第 27 回日本環境感染学会 2012. 2. 3-4.
2. 微酸性電解水のユニット水由来細菌に対する効果、中野雅子、高尾亞由子、前田伸子、第 20 回日本口腔感染症学会 学術集会 2011. 11. 12-13.
3. Toshiko Ozawa, Masako Nakano, Masanori Ikeno, Takashi Arai、Evaluation of slightly acidic electrolyzed water on dental chair unit water lines、FDI 2011 Annual World Dental Congress, Centro BANAMEX conventional and Exhibition Centre, Mexico City, 2011. 9. 14-17.
4. Nakano Masako, Takao Ayuko*, Ozawa Toshiko, Ikeno Masanori, Maeda Nobuko*, Arai Takashi Effect of slightly acidic electrolyzed water on bacteria from dental unit water、FDI 2011 Annual World Dental Congress, Centro BANAMEX conventional and Exhibition Centre, Mexico City, 2011. 9. 14-17.
5. 微酸性電解水の歯科用チェアユニット水回路の細菌汚染防止への有効性、池野正典、中野雅子、小澤寿子、黒瀬慎太郎、新井高、第 12 回口腔機能水学会学術大会 2011. 7. 30. 31.

6. クリーンシステム搭載歯科用ユニットの開発と評価、黒瀬慎太郎 池野正典 中野雅子 小澤寿子、鶴見歯学会第 73 回例会 2011. 6. 25.
7. 歯科用ユニット水回路への微酸性電解水供給システムの評価、池野正典、中野雅子、小澤寿子、黒瀬慎太郎、新井 高、第 134 回日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会 2011. 6. 9-10.
8. 歯科用ユニット水回路より分離した従属栄養細菌に対する微酸性電解水の有効性、中野雅子、高尾亞由子、小澤寿子、池野正典、前田伸子、新井 高、第 134 回日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会 2011. 6. 9-10

G. 参考文献

1. Williams JF, Andrews N, Santiago JI: Microbial contamination of dental unit waterlines: current preventive measures and emerging options; *Compend Contin Educ Dent* 17: 691-709, 1996.
2. Miller CH: Microbes in Dental Unit Water: *J Calif Dent Assoc* 24, 47-52, 1996.
3. Barbeau J, Gauthier C, Payment P: Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review; *Can J Microbiol* 44, 1019-1028, 1998.
4. Williams HN, Paszko-Kolva C, Shahamat M, Palmer C, Pettis C and Kelley J: Molecular techniques reveal high prevalence of *Legionella* in dental units; *J Am Dent Assoc* 127, 1188-1193, 1996.
5. Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, Avezard C, Trudel L, Côté L, Prévost

- AP: Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units; *Appl Environ Microbiol* 62, 3954-3959, 1996.
6. Mills SE, Lauderdale PW, Mayhew RB: Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%; *J Am Dent Assoc* 113, 280-284, 1986.
 7. Williams JF, Johnston AM, Johnson B: Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics; *J Am Dent Assoc* 124, 59-65, 1993.
 8. 荒木孝二, 臼井和弘, 毎熊容子, 黒崎紀正 : デンタルユニット水ラインの細菌汚染について ; *日歯保存誌* 43, 16-22, 2000.
 9. Tall BD, Willams HN, George KS, Gray RT, Walch M: Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes; *Can J Microbiol* 41, 647-654, 1995.
 10. Infection control recommendations for the dental office and the dental laboratory; *J Am Dent Assoc* 127, 672-680, 1996.
 11. Guidelines for infection control in dental health-care settings. *MMWR Morb Mortal Wky Rep* 55, 1-76, 2003.
 12. Coan LL, Hughes EA, Hudson JC, Palenik CJ: Sampling water from chemically cleaned dental units with detachable power scalers; *J Dent Hyg* 81, 80, 2007.
 13. Zhang W, Onyango O, Lin Z, Lee SS, Li Y: Evaluation of Sterilox for controlling microbial biofilm contamination of dental water;. *Compend Contin Educ Dent* 28, 586-592, 2007.
 14. Wirthlin MR, Marshall GW Jr, Rowland RW: Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines. ; *J Periodontol* 74, 1595-1609, 2003.
 15. Larsen T, Fiehn NE: The effect of Sterilex Ultra for disinfection of dental unit waterlines; *Int Dent J* 53, 249-254, 2003.
 16. Schel AJ., Marsh PD, Bradshaw DJ, Finney M, Fulford MR, Frandsen E, Østergaard E, Ten Gate JM, Moorer WR, Mavridou A, Kamma JJ, Mandilara G, Stösser L, Kneist S, Araujo R, Contreras N, Goroncy-Bermes P, O'Mullane D, Burke F, O'Reilly P, Hourigan G, O'Sullivan M, Holman R, and Walker JT: Comparison of the Efficacies of Disinfectants To Control Microbial Contamination in Dental Unit Water Systems in General Dental Practices across the European Union; *Appl Environ Microbiol* 72, 1380-1387, 2006.
 17. Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Mars PD: Microbiological Evaluation of a Range of Disinfectant Products To Control Mixed-Species Biofilm Contamination in a Laboratory Model of a Dental Unit Water System; *Appl Environ Microbiol* 69, 3327-3332, 2003.
 18. Meiller TF, Kelley JI, Baqui AA, DePaola LG. Laboratory evaluation of anti-biofilm agents for use in dental unit waterlines. *J Clin Dent* 12, 97-103, 2001.
 19. 小澤寿子, 中野雅子, 新井 高, 前田伸子, 斉藤一郎 : 歯科用ユニット水ラインのシヨ

- ックトリートメントの効果 —鶴見大学
歯学部附属病院での実践— ; 日歯保存誌
52, 363-369, 2009.
20. Meiller TF, Kelley JI, Zhang M, DePaola LG. Efficacy of A-dec's ICX dental unit waterline treatment solution in the prevention and treatment of microbial contamination in dental units. *J Clin Dent* 15, 17-21, 2004.
 21. von Fraunhofer JA, Kelley JI, DePaola LG, Meiller TF. Effect of a dental unit waterline treatment solution on composite-dentin shear bond strengths. *J Clin Dent* 15, 28-32, 2004.
 22. Ozawa T, Nakano M, Arai T. *In vitro* study of anti-suck-back ability by themselves on new high-speed air turbine handpieces. *Dent Mater J.* 29, 649-654, 2010.
 23. Yabune T, Imazato S, Ebisu S. Assessment of inhibitory effects of fluoride-coated tubes on biofilm formation by using the *in vitro* dental unit waterline biofilm model. *Appl Environ Microbiol.* 74, 5958-5964, 2008.
 24. 熊井慎太郎, 中野雅子, 金丸由幸, 小澤寿子, 新井高: 歯科用ユニットの洗浄・消毒への電解酸性機能水の応用に関する基礎的研究, *口腔機水誌* 7, 42-43, 2006.
 25. 小林茉莉, 金石あずさ, 塚崎弘明, 竹内理, 芝燦彦, 川和忠治, 霜島正浩, 山之内和久, 井田博久: 電解酸性機能水を使用した歯科用ユニットの殺菌消毒効果, *口腔機水誌* 8, 44-45, 2007.
1. 平成23年3月11日 知的財産権を鶴見大学 (代表者 木村清隆) に譲渡
 2. 特許出願 平成23年3月18日 特願 2011-060131 医科歯科用診療台
 3. 特許出願 平成23年3月18日 特願 2011-060132 医科歯科用診療台

H. 知的財産権の出願, 登録状況

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)
「歯科医療における院内感染防止システム普及のための評価指標の標準化とその応用について」

分担研究報告書

「バイオフィーム形成評価方法を利用した客観的な院内感染防止システム構築の検討」
「在宅歯科医療における院内感染防止システム普及のための評価指標の標準化の検討」

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)
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(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学 研究員)
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

① 細菌バイオフィームは院内感染の元凶であり、環境感染の汚染源となっている。また、生体の細菌バイオフィームは医学・歯学における個別の領域の枠を超えて総合的に理解されるべき病態であり、バイオフィーム感染症の予防と制御のための新規治療法・医療材料・抗バイオフィーム剤の開発に向けてブレークスルーが求められている。そこで、バイオフィーム形成阻害剤を効率的にスクリーニングするための新規マイクロデバイスの開発を行った。昨年度までにデバイスの基本設計に問題のないことを確認し、引き続きデバイスの有用性についてフローセルシステムで検討した結果、各種阻害候補化合物のスクリーニングに有用な実験系として確立することができた。本実験系は歯科医療における抗バイオフィーム剤の開発に向けて応用可能である。

② 医療依存度の高い入院患者に対して、口腔ケアを含む全身的な感染管理方法を確立することは重要である。そこで、地域中規模病院の障害者病棟に入院中の長期尿路カテーテル留置患者と長期留置歴のある患者を対象として、口腔(歯垢・粘膜)と吸引痰からの日和見病原菌の検出状況を調査した。臨床的背景や尿からの日和見病原菌の検出状況との関連性ならびに院内感染対策上の留意点について考察を行った結果、口腔は痰と同様に感染源として認識し、口腔ケアは気管吸引操作と同等の厳格な感染管理下にて実施する必要があると考えられた。通常、口腔や感染徴候のない患者に対する吸引痰の保菌調査は行わないので、口腔ケアや吸引が病原菌の伝播拡散の危険性を伴うことをコメディカルに啓発することが重要である。一方、慢性期病院のみならず在宅医療においても歯科医師・歯科衛生士とのさらなる連携による口腔ケアの改善が重要と考えられた。

A. 研究目的

① 細菌バイオフィームは院内感染の元凶であり、環境感染の汚染源となっている。また、生体の細菌バイオフィームは医学・

歯学における個別の領域の枠を超えて総合的に理解されるべき病態であり、バイオフィーム感染症の予防と制御のための新規治療法・医療材料・抗バイオフィーム剤

の開発に向けてブレークスルーが求められている。そこで、バイオフィーム形成阻害剤を効率的にスクリーニングするための新規マイクロデバイスの開発を行い、平成 22 年度に特許を取得した(特許第 4674337 号)。本年度は、最新型マイクロデバイス(薬剤混合タイプ)の有用性について、フローセルシステムにおいてバイオフィーム形成阻害候補化合物の評価を行った。

② 医療依存度の高い入院患者に対して、口腔ケアを含む全身的な感染管理方法を確立することは重要である。本年度は地域中規模病院の障害者病棟の入院患者を対象として、尿からの検出菌調査を後方視的に行い、口腔(歯垢・粘膜)と吸引痰からの日和見病原菌の検出状況との関連性について考察を行った。以上の研究を推進することにより、在宅歯科医療における院内感染防止システム普及のための評価指標の標準化を目指す。

B. 研究方法

① *Pseudomonas aeruginosa* OP14-210 株および GFP (green fluorescent protein) 産生 OP14-210(pMF230)株を用いた。最新型マイクロデバイス(薬剤混合タイプ)に一夜培養の菌液を接種して、37°C、2 時間放置したのち、人工尿を 20 mL/hr で灌流させ、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 (CLSM: Zeiss LSM 510)にて観察した。GFP 非産生株の場合は、蛍光染色キット (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits: Molecular Probes)を用いてバイオフィーム内の生菌と死菌を染め分けた。

② 長期尿路カテーテル留置患者と長期留置歴のある患者 27 名を対象にした。平均年齢は 76.6±15.1 歳、基礎疾患は遷延性意識障害や脳梗塞後遺症等であり、い

ずれも日常生活動作(ADL)が著しく低下した患者であった。調査は当施設の倫理委員会の承認および家族の同意を得た後に実施した。尿からの検出菌は後方視的に調査した。有菌顎患者 16 名は歯垢、無菌顎患者 11 名は口腔粘膜を検体とし、採取には日和見感染菌検査キット(BML 社)を使用した。採取時期は口腔ケア実施後 4 時間以降とした。吸引痰は気管カニューレあるいは鼻腔経由で下咽頭から気道内の痰を吸引し、吸引した痰に滅菌スワブを浸漬させ検体とした。細菌の菌種同定と概算菌数の算定は BML 社に依頼した。口腔と吸引痰から分離された MRSA(11 株)と緑膿菌(31 株)はパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析を行った。

C. 研究結果

① 最新型マイクロデバイス(薬剤混合タイプ)を用いた新規バイオフィームフローセルシステムにおいて、緑膿菌におけるクオラムセンシング機構の阻害剤として見出された 16 種類の化合物(100 μM)の評価を行った。GFP 産生株を用いて行った一連の実験で得られた画像は、キャピラリーフローセルシステムで得られた CLSM 画像と比較して、遜色ないことを確認した。一方、GFP 非産生株を用いて行った一連の実験において、抗菌薬の単独ならびに併用でのバイオフィーム形成阻害効果を検討した結果、キャピラリーフローセルシステムでの CLSM 画像と同様の成績(生菌ならびに死菌イメージ)が得られた。

② 主要日和見病原菌が口腔と吸引痰から分離された患者は、緑膿菌がそれぞれ 15 名、16 名、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が 8 名、4 名、セラチア菌が 8 名、8 名、肺炎桿菌が 3 名、4 名であった。比較的多い菌数($10^3 \sim 10^5$ CFU/mL)の検

出を認めた患者はそれぞれ 16 名、14 名、複数菌種が分離された患者はそれぞれ 12 名、11 名であった。尿から MRSA の検出を認めた患者は 5 名、緑膿菌は 14 名、肺炎桿菌は 1 名であった。PFGE 解析の結果、MRSA は異なる患者間 4 名に同一株 1 組と類似株 1 組を認めたが、緑膿菌は異なる患者間で同一株と類似株を認めなかった。

D. 考察

① 岡山大学泌尿器病態学分野では、平成 14 年度に導入した *in vitro* バイオフィルム実験モデル系のキャピラリーフローセルシステムを使用して、各種阻害候補化合物を評価してきたが、より効率的にスクリーニングできるデバイスの開発が望まれた。バイオフィルム研究の基盤技術については、これまでも多くの提案がなされ、各種デバイスが開発されてきた。各々の菌種が単独あるいは複数で形成するバイオフィルムは、環境条件により多様性に富む構造体となることから、構造体内部の微生物の生態は複雑で捉えがたい。従って、抗バイオフィルム剤の開発には、様々な研究手法による多面的アプローチが必要である。平成 22 年度に特許を取得した新規マイクロデバイスは特許技術実施許諾済みであり、各研究室の観察・検討内容に応じて、オリジナルのデバイスの製作(カスタムメイド)に対応できる体制が整っている。

本年度、最新型マイクロデバイス(薬剤混合タイプ)の有用性についてフローセルシステムにおいて検討した結果、各種阻害候補化合物のスクリーニングに有用な実験系として確立することができた。本実験系は歯科医療における抗バイオフィルム剤の開発に向けて応用可能である。

② 調査を行った患者 27 名中 23 名は、口腔(歯垢・粘膜)や吸引痰に日和見病原

菌を保菌しており、16 名は口腔と吸引痰からの分離株が同一菌種であった。尿からの検出菌が口腔と吸引痰と同種であった患者は 9 名で、全て緑膿菌であった。PFGE 解析において、MRSA の交差感染が確認された。通常、口腔の日和見病原菌の保菌調査は実施されないため、口腔ケアを行う看護師や看護助手は、口腔ケアが病原菌の伝播拡散の誘引と考えるよりもむしろ、口腔内汚染を浄化させる機会として捉える。医療従事者の口腔ケアによる交差感染リスクの認識は気管吸引に比べて低く、日和見病原菌の伝播拡散防止のためには、障害者病棟患者の多くが口腔や吸引痰に日和見病原菌を保有していることを周知させる必要がある。口腔ケアを必要とする患者の多くは喀痰吸引のみならず排泄・皮膚ケアなどの日常生活ケアを必要としており、院内感染対策上、日和見病原菌の保菌患者に対しては標準予防策と接触予防策を厳格に実施する必要がある。特に医療依存度の高い患者に対しては、歯科医師・歯科衛生士との連携を促進し、口腔ケアを含む全身的な感染管理方法を確立することが重要である。

E. 結論

近年、多剤耐性菌による感染症の医療現場への影響は一層拡大しており、バイオフィルム対策を含む環境感染対策の重要性が増している。歯科医療においては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対策にも留意する必要があり、新規抗バイオフィルム剤の開発に取り組むことも重要である。一方、慢性期病院のみならず在宅医療においても口腔ケアの改善を推進することが必要であり、歯科医師・歯科衛生士とのさらなる連携が求められている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 狩山玲子、金原和秀、高野和潔、妹尾典久、大森啓士、光畑律子、桐田泰三、公文裕巳：緑膿菌性バイオフィルム形成阻害剤のスクリーニングにおける新規マイクロデバイスの有用性について。緑膿菌感染症研究会講演記録 45: 84-88, 2011.
- 2) 狩山玲子、光畑律子、上原慎也、渡辺豊彦、公文裕巳：緑膿菌性尿路バイオフィルム *in vitro* 実験モデル系におけるコリスチンの有効性評価。Bacterial Adherence & Biofilm (印刷中)
- 3) 山本満寿美、狩山玲子、光畑律子、原田悦子、吉本静雄：長期尿路カテーテル留置患者の口腔および吸引痰からの日和見病原菌の検出状況。(投稿中)

2. 学会発表

- 1) 第 85 回 日本感染症学会総会：東京 2011, 4. 21-22
「バイオフィルム形成阻害剤のスクリーニングにおける新規マイクロデバイスの有用性に関する検討」
狩山玲子、上原慎也、公文裕巳
- 2) 第 59 回 日本化学療法学会総会：札幌 2011, 6. 23-25
「新規マイクロデバイスにおける緑膿菌性バイオフィルムに対するコリスチンの有効性評価」
狩山玲子、光畑律子、上原慎也、渡辺豊彦、公文裕巳
- 3) 第 22 回 尿路感染症研究会：岐阜 2011, 10. 16
「緑膿菌性尿路バイオフィルム新規 *in vitro* 実験モデル系での抗バイオフィルム剤の探索」
狩山玲子、光畑律子、和田耕一郎、上原慎也、渡辺豊彦、公文裕巳

- 4) The Joint Meeting of The XVIIth International Symposium on Gnotobiology and The XXXIVth Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease: Yokohama, Japan 2011, 11. 20-23
「Development of novel methods for the search of antibiofilm agents」
Reiko Kariyama, Hiromi Kumon