

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

*Opportunistic pathogens detected in the oral cavity and sputum of patients with
long-term catheterization in the urinary tract*

山本満寿美^{1,2)}・狩山玲子¹⁾・光畑律子¹⁾・原田悦子²⁾・吉本静雄²⁾

Masumi YAMAMOTO^{1,2)}, Reiko KARIYAMA¹⁾, Ritsuko MITSUHATA¹⁾

Etsuko HARADA²⁾ and Shizuo YOSHIMOTO²⁾

¹⁾*Okayama University Graduate School of Medicine,*

Dentistry and Pharmaceutical Sciences

²⁾*Division of Infection Control, ³⁾Department of Medicine, Kousei Hospital*

¹⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

²⁾光生病院感染管理室 ³⁾光生病院内科

要 旨

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、口腔(歯垢・粘膜)と吸引痰からの日和見病原菌の検出状況の調査ならびに尿からの検出菌調査を後方視的に行った。さらに口腔と吸引痰から分離された MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) 11 株と *Pseudomonas aeruginosa* 31 株について、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。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、*P. aeruginosa* がそれぞれ 15 名, 16 名, MRSA が 8 名, 4 名, *Serratiamarcescens* が 8 名, 8 名, *Klebsiellapneumoniae* 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, *P. aeruginosa* は 14 名, *K. pneumoniae* 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, *P. aeruginosa* は異なる患者間で同一株と類似株を認めなかった。口腔は痰と同様に感染源として認識する必要があり, 口腔ケアは気管吸引操作と同等の厳格な感染管理下の実施が重要である。

Key words: 長期尿路カテーテル留置患者, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*,

院内感染, 口腔ケア

はじめに

口腔ケアは誤嚥性肺炎の予防に効果があるとの報告があり、近年は口腔ケアに対する積極的な取り組みが報告されている^{1~5)}。筆者らも重症心身障害者(児)を対象に消毒・除菌効果が高いと期待できる口腔ケアを実施し、5ヶ月後に歯垢からの検出菌種と菌数の減少に一定の効果を得た⁶⁾。しかしその一方で *Pseudomonas aeruginosa* が陰性化した事例は14%と除菌困難であることや、誤嚥性肺炎患者の退院時の口腔内日和見病原菌検査において、*P. aeruginosa* が定着している事例を認めた⁷⁾。また、誤嚥性肺炎患者の中に入院時には検出されなかった MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) が入院後3日目以降に検出された事例があり⁷⁾、口腔内に存在している日和見病原菌が口腔ケアや喀痰吸引手技により伝播拡散した可能性が推察された。

口腔ケアを必要とする患者は吸引などの呼吸管理のみならず、排泄や皮膚ケアのため長期的に尿路カテーテル留置を余儀なくされる患者が多く、長期尿路カテーテル留置患者(以下、留置患者)においても、重症心身障害者(児)や誤嚥性肺炎患者と同様に口腔(歯垢・粘膜)に日和見病原菌を保有していることが推察される。A病院においては気管吸引操作の感染リスクの重大性はよく認識されており、厳格な感染管理のもとに実施されているが、口腔ケアに関しては、手袋、エプロン、マスクなどの着用率が低く、口腔ケア後に尿路カテーテル集尿バッグからの採尿操作を行っていることがあり、口腔内の日和見病原菌が口腔ケアを介した尿路カテーテル留置患者における尿路感染の感染源となっている可能性が考えられた。

本研究では、長期尿路カテーテル留置患者に対する尿路感染管理に関するエビデンスを得る目的で、口腔(歯垢・粘膜)および吸引痰からの日和見病原菌の検出状況の調査を行い、尿からの検出状況については後方視的に調査を行った。口腔と吸引痰から分離された MRSA と *P. aeruginosa* は、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による分子疫学的解析を行った。

対象と方法

1. 対象

地域中規模 A 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9名と以前に長期尿路カテーテル留置歴のある患者(非留置)18名、計27名を対象とした。

患者の家族には文書と口頭で研究の趣旨を説明し、研究参加の同意が得られた後に調査を実施した。なお本調査は、A 病院臨床検査倫理審査委員会の承認(2009 年 10 月)後、2009 年 11 月～2010 年 2 月に実施した。

2. 口腔(歯垢・粘膜)と吸引痰からの検体採取および検出菌の菌種同定と概算菌量

口腔ケア実施後 4 時間以降に、日和見感染検査キット(BML 社)の滅菌スワブを用いて、有菌顎患者(上顎臼歯部 5・6・7 番相当部)は歯垢ならびに無菌顎患者は頬側歯頸部の口腔粘膜を 5 往復擦過し検体とした⁶⁻⁸⁾。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。滅菌スワブ(検体)はカルチャー用滅菌チューブに挿入し、専用の輸送封筒に入れて室温にて送付し、BML 社に分離・同定と簡易定量(+ : 10^3 , ++ : $10^3 \sim 10^5$, +++ : 10^5 CFU/mL)を委託した。検査対象菌は MRSA, MSSA (methicillin sensitive *S. aureus*), *P.aeruginosa*, *Serratiamarcescens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiellapneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, β 溶血性 *Streptococcus* 属の 9 種とした⁶⁾。

3. 尿からの検出菌の後方視的調査

口腔と吸引痰の検体採取期間中(2009 年 11 月～2010 年 2 月)および採取前 6 ヶ月(2009 年 5 月～2009 年 10 月)における 27 名の尿培養実施の有無を後方視的に調査し、口腔および吸引痰の検査対象菌 9 種について検出の有無を確認した。なお、検出菌量は 10^4 CFU/mL 以上とした。

4. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法

分離された MRSA 11 株と *P. aeruginosa* 31 株は、PFGE 法による分子疫学的解析を行った。

1) MRSA

供試菌を 0.5 mL ブレインハートインフュージョン液体培地中、37°C で一晩培養し、遠心後、沈渣にバッファー(10 mM Tris pH7.6, 1 M NaCl)を 0.5 mL 加え懸濁した。懸濁した菌液と 55°C に加温した 1.2% アガロースゲル(BIO-RAD)を 50 μ L ずつ等量混合し、ゲルブロックを作製した。固まったゲルブロックを 24 穴プレートに入れ、リゾスタフィン-リゾチーム溶液(50U/mL lysostaphin, 6 mM Tris pH7.6, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% Brij-58, 0.2% deoxycholate, 0.5% sarcosine, 20 μ g/mL RNase, 1

mg/mL lysozyme)を加え 37°Cで一晩緩やかに振盪して溶菌処理を行った。その後、プロテナーゼ溶液(0.5 M EDTA pH9.5, 1% sarcosine, 1 mg/mL proteinase K) 1 mL に交換し, 55°C一晩静置して蛋白分解を行った。ゲルブロックを洗浄バッファー(10 mMTris pH7.5, 0.1 mM EDTA) で洗浄後, 1mm 幅程度に切断し, *Sma*I バッファー(10 U/200 μ L, New England Biolabs) で DNA を消化した。0.8%アガロースゲル(BIO-RAD)に制限酵素処理したゲルを包埋し, 0.5 \times TBE バッファー(44.5 mMTris, 44.5 mM ホウ酸, 50mM EDTA \cdot 2Na pH8.0) を用い CHEF DR-III (BIO-RAD) にて泳動した。泳動条件は電圧 6V/cm, パルスタイム 1~12 秒, 泳動時間は 18.5 時間, 泳動バッファー温度 14°C, サイズマーカーはラムダラダー (BIO-RAD)を用いた。泳動終了後, アガロースゲルを 1 \times SYBR Green I (Molecular Probes) で染色し, GelDoc XR (BIO-RAD) にて撮影した。クラスター解析には, Fingerprinting II (BIO-RAD)を使用した。

2) *P. aeruginosa*

MRSA 同様にゲルブロックを作製後, 固まったゲルブロックを 24 穴プレートに入れ, リゾチーム溶液(10 mMTris pH7.2, 50 mMNaCl, 0.2% sodium desoxycholate, 0.5% sodium lauryl sarcosine, 1 mg/mL lysozyme) を 0.5 mL ずつ加え, 37°Cで 2 時間緩やかに振盪して溶菌処理を行った。その後, プロテナーゼ溶液(100 mM EDTA \cdot 2Na pH8.0, 50 mMNaCl, 0.2% sodium desoxycholate, 1% sodium lauryl sarcosine, 1 mg/mL proteinase K) 0.5 mL に交換し, 50°C一晩静置して蛋白分解を行った。制限酵素処理は *Spe*I バッファー(10 U/20 μ L, New England Biolabs)を用いて行い, パルスタイムは1~23 秒(その他の条件は MRSA 同様)で泳動, 撮影後クラスター解析を行った。

結果

1. 患者の背景

患者 27 名の背景を表 1 に示した。年齢は 31~93 歳, 平均 76.6(\pm 15.1)歳で, 男性 12 名(留置 8 名, 非留置 4 名), 女性 15 名(留置1名, 非留置 14 名)であった。基礎疾患は脳梗塞 6 名, パーキンソン氏病 5 名, 頸髄損傷 4 名などであり, 意識レベルは「覚醒している」患者 1 名, 「刺激に応じて覚醒する」患者 20 名, 「覚醒しない」患者 6 名であった。日常生活動作(ADL)の自立度は, 全員が障害老人の日常生活

自立度判定基準のランクCに該当する寝たきりの状態であった。有菌顎患者は16名、無菌顎患者は11名であった。気管切開を受けている患者は18名であり、そのうち人工呼吸器を装着している患者は9名であった。27名の患者は1日1～3回看護師や看護助手による口腔ケアを受けていた。

2. 口腔(歯垢・粘膜)と吸引痰からの日和見病原菌の検出状況

患者の口腔と吸引痰からの日和見病原菌の検出状況を表2に示した。口腔／吸引痰から検出された日和見病原菌は、MRSA 8/4株、MSSA 1/0株、*P. aeruginosa* 15/16株、*S. marcescens* 8/8株、*S. pneumoniae* 0/1株、*H. influenzae* 0/0株、*K. pneumoniae* 3/4株、*M. catarrhalis* 0/0株、β溶血性 *Streptococcus* 属 3/1株であった。口腔からの分離株は、*P. aeruginosa* が15株と最も多く、次いで *S. marcescens* (8株)とMRSA (8株)であった。吸引痰からの分離株は *P. aeruginosa* が16株と最も多く、次いで *S. marcescens* (8株)であった。口腔や吸引痰から検出された菌数が比較的高い(++、+++)菌種は、*P. aeruginosa* 20株(++ 11株、+++ 9株)、*S. marcescens* 15株(+++), *K. pneumoniae* 7株(+++)の3菌種であった。

口腔や吸引痰に日和見病原菌を保有している患者は23名(85.2%)であった。口腔からの日和見病原菌が比較的高い(++、+++)菌数で検出された患者は16名、吸引痰からは14名であった。口腔から複数菌種の分離を認めた患者は12名(3菌種6名、2菌種6名)、吸引痰は11名(3菌種3名、2菌種8名)であった。口腔から複数菌種が分離された12名のうち、分離菌種が同じ組み合わせの患者は9名(MRSA・*P. aeruginosa*・*S. marcescens* : 3名、MRSA・*P. aeruginosa*・*K. pneumoniae* : 2名、MRSA・*P. aeruginosa* : 2名、*P. aeruginosa*・*S. marcescens* : 2名)であった。吸引痰から複数菌種が分離された11名のうち分離菌種が同じ組み合わせの患者は7名(MRSA・*P. aeruginosa*・*K. pneumoniae* : 2名、*P. aeruginosa*・*S. marcescens* : 5名)であった。口腔と吸引痰ともに複数菌種の分離を認めた患者は8名であった。口腔と吸引痰から同一菌種の分離を認めた患者は16名であり、菌種別ではMRSA 3名、*P. aeruginosa* 13名、*S. marcescens* 6名、*K. pneumoniae* 3名、β溶血性 *Streptococcus* 属 1名であった。

3. 尿からの日和見病原菌(検査対象菌9種)の検出状況

口腔と吸引痰からの検体採取期間中および採取前6ヶ月において、27名全員が

尿細菌培養検査を実施されていた。検査対象菌が検出された患者は16名、検出された菌種はMRSA, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* の3菌種であった。MRSAが検出された患者は5名、*P. aeruginosa*は14名、*K. pneumoniae* は1名であった。2菌種以上の検出を認めた患者は4名(MRSA・*P. aeruginosa*: 3名, *P. aeruginosa*・*K. pneumoniae*:1名)であった(表1)。

4. 分離株(MRSA および *P. aeruginosa*) の PFGE 解析

MRSA 11株のデンドログラムを作成した結果、類似係数85%の類似株を2組、類似係数100%の同一株を1組認めた(図1)。同一株1組(2株)は異なる患者の口腔粘膜由来株であった。類似株2組のうち1組(2株)は、異なる患者の口腔粘膜と歯垢由来株であり、もう1組(3株)は同一患者の口腔粘膜と吸引痰由来株および異なる患者の口腔粘膜由来株であった。類似株や同一株が検出された4名は異なる病室の患者であった。*P. aeruginosa* 31株のデンドログラムでは、類似株2組と同一株1組を認めた(図2)。同一株・類似株の3組は全て同一患者の口腔粘膜と吸引痰由来株であり、異なる患者間における類似株・同一株は認めなかった。

考 察

障害者病棟の留置患者の8割が口腔(歯垢・粘膜)や吸引痰に日和見病原菌を保有しており、半数以上の患者から比較的高い菌数で複数菌種が検出された。

自立高齢者の口腔内日和見病原菌の検出菌種数は平均 0.48 ± 0.61 種、非検出の高齢者が57.1%と過半数を占めているのに対し⁹⁾、本研究における障害者病棟に入院中の留置患者の口腔からの検出菌種数は平均 1.33 ± 1.18 種、検出された患者が85.2%であり、平均検出菌種数および菌検出率は顕著に高かった。口腔から検出された菌種のなかで検出率の高かったのは*P. aeruginosa*, *S. marcescens*であり、重症心身障害者(児)⁶⁾や施設内高齢者^{1,10)}の歯垢内調査と同様の結果であった。27名のADLは極めて低く、日々看護師や看護助手は口腔ケアを行っているものの、健常者が行う歯磨きや含嗽の頻度には及ばず、健常者のような口腔内の清浄化は困難である。胃瘻や胃管による食事摂取は、嚥下や咀嚼による唾液分泌を促すことができず、喀出した痰が歯表面や口腔粘膜に付着した状態が持続していないとも限らない。咀嚼は歯垢中の細菌を脱落させ飲食物とともに胃に送り込むため、口腔内細菌の減少に関わる¹¹⁾。しかし、27名は経管栄養であるため、咀嚼に伴う口腔内細菌の減少

は望めず、細菌数は増加する。*P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae* の 3 菌種は、検出菌数が比較的高く、口腔(菌垢・粘膜)や吸引痰から検出されている。また複数菌種分離症例では、この 3 菌種のいずれかの分離を認めていることから、これら 3 菌種は歯表面や口腔粘膜に付着し、菌体周囲に多糖体を産生してバイオフィルムを形成させ、その内部に MRSA など複数の菌種を集積させていると考えられる。重症心身障害者(児)の口腔ケアへの介入研究において、介入後 5 ヶ月後の MRSA の除菌率は、*P. aeruginosa* を保菌していない障害児(者)は 60%であるのに対し、保菌していた障害児(者)は 44.4%にとどまっている⁶⁾。本研究においても口腔から *P. aeruginosa* が検出された 15 名のうち 7 名は MRSA を保菌しており、*P. aeruginosa* のみならず MRSA の除菌が困難であることが予測された。

障害者病棟対象患者の尿由来細菌検出状況を後方視的に調査した結果、本研究の対象菌種が留置患者 27 名中 16 名(59%)から検出されていた。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 *P. aeruginosa* であった。9 名のうち 2 名は尿路カテーテルが留置されており、口腔や吸引痰の *P. aeruginosa* が、口腔ケアや吸引後の尿路カテーテル収集バッグからの採尿操作を介して伝播した可能性も考えられた。障害者病棟の留置患者は重度の意識障害のため看護師や看護助手の日常生活ケアを頻繁に必要とする。なかでも障害者病棟で定期的に行われる体位変換は喀痰喀出の機会となるため吸引は欠かせず、看護師は吸引後にオムツ交換などの排泄ケアを行っている。時として患者の状況から一つのケアが完結することなく連続して次のケアの実施が余儀なくされることがあり、厳格な標準予防策を実施することが困難な状況がないわけではない。煩雑が故に、通常患者へのケアは看護師と看護助手がペアで実施しているが、標準予防策と接触予防策の実施の徹底には第三者が現場で確認し指導喚起することも必要である。

PFGE 解析の結果、MRSA 分離患者では異なる患者間で同一株 1 組と類似株 1 組を認めた。4 名は異なる病室の患者であり、口腔ケアや吸引等による直接的な交差感染よりも環境中に付着生息した MRSA によるものと考えられた。ブラッシングによる口腔ケア後は、口腔ケア実施者の胸部や患者の左右 90 cm の箇所において口腔内細菌の飛散が確認されている¹²⁾。MRSA は乾燥に強く、滅菌した商品包装の外部表面で 38 週間以上生息していたとの報告もある¹³⁾。27 名の口腔ケアにおいて、患者専用

の歯ブラシを使用し唾液や洗浄液を誤嚥させないように口腔内を吸引しながら行うことが多い。口腔ケアは口腔内周囲に限らず予想以上に広い範囲を汚染しており、環境中に生息しているMRSAが交差感染を引き起こしている可能性は否定できない。80歳以上の高齢者や尿路カテーテル留置患者はMRSAの検出率は高く¹⁴⁾、障害者病棟入院中の留置患者においてもMRSAを保菌している可能性は高いと考えられる。*P. aeruginosa*分離患者では、類似株2組と同一株1組を認め、全て同一患者の口腔粘膜と吸引痰由来株であった。これは口腔粘膜に付着していた*P. aeruginosa*を誤嚥したのか、あるいは気道から喀出された痰が口腔内に付着し*P. aeruginosa*が検出されたものと考えた。調査時点において*P. aeruginosa*が吸引痰から検出された患者では、口腔からは非検出であっても喀出した痰の付着により、後日*P. aeruginosa*が口腔内に定着する可能性を考慮する必要がある。

本研究において調査を行った留置患者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。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、障害者病棟の留置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ことが重要である。

今後は、口腔(歯垢・粘膜)や気道内に保菌している日和見病原菌の検出菌種や菌数の推移を引き続き調査を行うとともに、尿路への感染が惹起されていないか検証しエビデンスを確立していくことが課題である。

謝 辞:本調査を行うにあたり、ご協力いただいた被験者の皆様、A病院障害者病棟看護師長および病棟スタッフの皆様に感謝いたします。本研究は、厚生労働科学研究費(平成19～21年度:H19-医療-一般-007,平成22～23年度:H19-医療-一般-026)ならびに日本学術振興会科学研究費(平成22～24年度:基盤C 22591791)の一環として遂行した。

文 献

- 1) 榎安秀樹, 弘中祥司, 村田尚道, 向井美恵. 要介護高齢者における日和見感染菌と全身状況との関連. 老年歯科医学 2008;23(2):106-14.
- 2) 中村佳子, 澤田有加, 木下京子, 長谷川せい子, 高須朝恵, 中田康夫. 口腔ケアに関する研究の動向と今後の課題;系統的文献レビューをとおして. 臨床看護 2009;35(3):426-31.
- 3) 笹岡邦典, 茂木健司, 神野恵治, 根岸明秀. 各種口腔ケアの効果に関する検討 口腔常在菌数を指標として 第3報ブラッシングの効果. Kitakanto Medical Journal 2008;58(2):147-51.
- 4) 大岡貴史, 渡邊賢礼, 木村有子, 柴田由美, 小出洋子, 鈴木恵美, 他. 急性期病院における口腔ケア活動と口腔内状況の変化について. 障害者歯科 2010;31(4):749-57.
- 5) 中村佳代子, 東山政子, 久保田香代子, 平尾直美, 渡邊ルミ, 牧野亜紀子, 他. 摂食・嚥下障害を有する患者への専門的口腔ケア～摂食・嚥下リハビリテーションチームにおける歯科衛生士の取り組み～. 日本歯科衛生士学会雑誌 2008;3(1):27-34.
- 6) 森みずえ, 山本満寿美, 千田好子, 狩山玲子. 重症心身障害者(児)の歯垢内日和見病原菌の検出状況を指標とした口腔ケアの評価. 環境感染誌 2010;25(2):91-8.
- 7) 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. 環境感染誌 2008;23(2):97-103.
- 8) 森みずえ, 千田好子, 光畑律子, 狩山玲子. 気管内吸引を必要とする長期在宅療養患者に対する感染管理と口腔ケアの実態調査. 環境感染誌 2009;24(1):27-35.
- 9) 清水孝悦, 田中とも子, 佐藤勉. 自立高齢者における口腔日和見菌に関する口腔保健学的研究. Bacterial Adherence 研究 2006;20:63-9.
- 10) 泉福英信, 十亀輝, 由川英二, 花田信弘. 特別養護老人ホーム等施設内高齢者の口腔バイオフィルム内細菌群と全身疾患との関係. Bacterial Adherence 研究

2000;14:21-6.

- 11) 奥田克爾. 口腔ケアにおける口腔内バイオフィルムコントロールの重要性. ICU と CCU 2009;33(10):749-56.
- 12) 前田知子, 大谷久美, 金中章江, 宮川淳子. 口腔ケア時における口腔内細菌の飛散状況. 感染防止 2006;16(2):28-33.
- 13) Dietze B, Rath A, Wendt C, Martiny H. Survival of MRSA on sterile goods packaging. J Hosp Infect 2001; 49(4):255-61.
- 14) 島田憲明, 岡村央, 渡部江津子, 清水彩加, 三浦邦久. ハイリスク報告から推定される内科入院患者の MRSA 検出危険度. 環境感染誌 2007;22(1):23-7.

Opportunistic pathogens detected in the oral cavity and sputum of patients with long-term catheterization in the urinary tract

Masumi YAMAMOTO^{1,2)}, Reiko KARIYAMA¹⁾, Ritsuko MITSUHATA¹⁾
Etsuko HARADA²⁾ and Shizuo YOSHIMOTO²⁾

¹⁾Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

²⁾Division of Infection Control, ³⁾Department of Medicine, Kousei Hospital

Abstract

Opportunistic pathogens detected in the oral cavity (plaque or mucosa) and sputum of 27 patients with present and past long-term catheterization in the urinary tract, in the wards for disabled people in a mid-sized urban hospital of Okayama city were investigated, and the pathogens detected in urine were examined in retrospective medical records of these patients. In addition, 11 isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and 31 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from oral and sputum samples were epidemiologically characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The major opportunistic pathogens isolated from oral and sputum samples were *P. aeruginosa* in 15 and 16 patients, MRSA in 8 and 4 patients, *Serratiamarcescens* in 8 and 8 patients and *Klebsiellapneumoniae* in 3 and 4 patients, respectively. From oral and sputum samples, a relatively higher number of colony forming units ($10^3\sim 10^5$ CFU/mL) was detected in 16 and 14 patients, and multiple species were detected in 12 and 11 patients, respectively. From urine samples, MRSA in 5 patients, *P. aeruginosa* in 14 patients and *K. pneumoniae* in 1 patient had been detected. PFGE analysis showed that identical (one pair of 2 patients) and similar (one pair of 2 patients) patterns in MRSA isolates from 4 different patients were found, but no identical and similar patterns in *P. aeruginosa* isolates from different patients were found. It is important to recognize the oral cavity (plaque and/or mucosa) as well as sputum as reservoirs of opportunistic pathogens and adhere strict infection control procedures for both oral care and endotracheal suctioning practices.

Key words : patients with long-term catheterization in the urinary tract, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, hospital-acquired infection, oral care

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

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学

狩山玲子，光畑律子，上原慎也，渡辺豊彦，公文裕巳

Bacterial Adherence and Biofilm (印刷中)

要旨：新規マイクロデバイスを用いた緑膿菌性尿路バイオフィルム *in vitro* 実験モデル系において、コリスチン(CMS)の有効性評価を行った。*Pseudomonas aeruginosa* OP14-210 株および GFP 産生 OP14-210 (pMF230) 株を用いた。人工尿における浮遊菌に対する CMS の MIC は $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。マイクロデバイスに菌液を接種して人工尿を $20 \text{ mL}/\text{hr}$ で灌流させ、薬剤無添加と薬剤作用後のバイオフィルムを共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。GFP 産生株に $5 \times \text{MIC}$ 濃度で CMS を作用させて 72 時間後のバイオフィルム形成を観察すると、薬剤無添加に比較して阻害効果を認めた。GFP 産生株が 24 時間で形成したバイオフィルムに CMS を $10 \sim 50 \times \text{MIC}$ 濃度で 24 時間作用させると、薬剤無添加のバイオフィルムに比較して、厚さが約 $1/2 \sim 1/6$ に減少し、バイオフィルムの剥離が観察された。GFP 非産生株が 24 時間で形成したバイオフィルムに CMS を $20 \times \text{MIC}$ 濃度で 48 時間作用させて蛍光染色して観察すると、薬剤無添加のバイオフィルムに比較して死菌イメージが増強した。本検討においてバイオフィルム形成阻害効果を認めた CMS の $5 \sim 20 \times \text{MIC}$ 濃度は、ヒトへの通常投与量で尿中に達する濃度範囲にあることから、尿路における緑膿菌性バイオフィルム感染症の治療に有効である可能性が示唆された。

Key words : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, urinary tract, colistin , microdevice

序 文

難治性感染症の多くに細菌バイオフィルムが関与しており、バイオフィルム感染症に対する予防法や治療法の開発が求められている¹⁻⁵⁾。緑膿菌はバイオフィルム形成能が高く、尿路バイオフィルム感染症の主たる原因菌である。細菌バイオフィルムの関与が強いカテーテル留置の複雑性尿路感染症においては、緑膿菌がもっとも高頻度に分離され、多剤耐性緑膿菌(MDRP)の分離頻度も増加している⁶⁻⁸⁾。MDRPに対して単独療法として期待できる抗菌薬は極めて限られているが、コリスチンは残された治療手段のひとつである^{9, 10)}。そこで、新規マイクロデバイス(bio 観る[®])^{11, 12)}を用いた緑膿菌性尿路バイオフィルム *in vitro* 実験モデル系において、コリスチンの有効性評価を行った。

材 料 と 方 法

Pseudomonas aeruginosa OP14-210 株および GFP 産生 OP14-210 (pMF230) 株を用いた。人工尿における浮遊菌に対するコリスチン (colistin methanesulfonate: CMS) の MIC は 1 μ g/mL であった。新規マイクロデバイス (Fig.1) に一夜培養の菌液を接種して、37 $^{\circ}$ 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ル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ルム内の生菌と死菌を染め分けた。

成 績

P. aeruginosa OP14-210 (pMF230) 株を接種して2時間後よりCMSを作用させて72時間後のバイオフィルム形成を観察すると、1~3 x MIC濃度ではバイオフィルム形成が促進していたが、5 x MIC濃度で阻害効果を認め、薬剤無添加に比較してバイオフィルムの厚さは約1/3であった (Fig. 2)。*P. aeruginosa* OP14-210 (pMF230) 株が24時間で形成したバイオフィルムにCMSを10~50 x MIC濃度で24時間作用させると、薬剤無添加のバイオフィルム(48時間)に比較して、厚さが約1/2~1/6に減少し、バイオフィルムの剥離が観察された。1 x MIC濃度ではバイオフィルム形成が促進していた (Fig. 3)。*P. aeruginosa* OP14-210 株が24時間で形成したバイオフィルムに、CMSを20 x MIC濃度で48時間作用させて蛍光染色して観察すると、薬剤無添加のバイオフィルム(72時間)に比較して死菌イメージが増強した (Fig. 4)。

考 察

尿路バイオフィルム感染症は、通常臨床症状に乏しく比較的穏やかな感染症であるが、一旦、尿流障害を合併すると敗血症に移行し、宿主を重篤化させる。また、除菌が困難であるため感染が持続し、院内感染の感染源となっている。特に、MDRPによる尿路バイオフィルム感染症の持続が宿主とそれを取り巻く環境に及ぼす影響を考えると、新たな治療戦略を考

案することは重要である⁶⁻⁸⁾。

in vitro 実験系は、臨床での治療効果のメカニズム解明と抗菌薬投与計画のエビデンス創出に有用であると考えられる。2002年に導入したキャピラリーフローセルシステムは、緑膿菌がキャピラリー中に形成したバイオフィルムを共焦点レーザー走査型顕微鏡でリアルタイムに観察する実験系として確立し、阻害候補化合物の評価系として進化を遂げてきた¹³⁾。2008年に設計を開始した新規マイクロデバイス「bio 観る[®]」は、抗バイオフィルム剤の効率的なスクリーニングを目的としており、2011年2月に特許を取得した。協和フアインテック株式会社 (<http://www.kyowa-ft.co.jp>) に「bio 観る[®]」の特許技術実施を許諾しており、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。本研究では、薬剤混合型の「bio 観る[®]」(Fig. 1)を使用して評価を行った^{11, 12)}。流路数が9本ある最新型チャンバー(段差なしタイプ)、パッキン、カバーガラスのみのシンプルな構成で、チューブ(カニューラ)はフローセルシステムにワンタッチで接続できる。

MDRPによる感染症の治療には、古典的な抗菌薬であるコリスチンの有効性が海外で示されており、日本でも注射剤の使用に向けて開発が行われている。本検討においてバイオフィルム形成阻害効果を認めたCMSの5~20 x MIC濃度は、ヒトへの通常投与量で尿中に達する濃度範囲にあることから、尿路における緑膿菌性バイオフィルム感染症の治療に有効である可能性が示唆された。ただし、1~3 x MIC濃度にお

いてバイオフィルム形成の促進を認めたことから、併用療法に関する検討が必要であると考えられた。岡山大学泌尿器病態学分野では、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療法に関する検討を *in vitro* および *in vivo* 実験系を用いて重ねてきた¹⁴⁻¹⁷⁾。コリスチンについても各種抗菌薬との併用効果の検討が必要であり、MDRPを用いた比較検討も重要であると考えられる。また、副作用を考慮にいたした臨床的有用性についての検討も今後の課題である。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究C：No.21592073）および厚生労働科学研究費補助金（H22-医療－一般－026）の助成を受けて行った。

文 献

- 1) Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol, 2: 95-108, 2004.
- 2) Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, 15: 167-93, 2002.
- 3) Lewis K: Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother, 45:

999-1007, 2001.

- 4) Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O: Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 35: 322-32, 2010.
- 5) del Pozo JL, Patel R: The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther*, 82: 204-9, 2007.
- 6) Kumon H: Pathogenesis and management of bacterial biofilms in the urinary tract. *J Infect Chemother*, 2: 18-28, 1996.
- 7) 門田 晃一, 狩山 玲子, 公文 裕巳: 緑膿菌性尿路感染症: どう対峙するか. 緑膿菌感染症研究会講演記録 42: 27-30, 2008.
- 8) 狩山 玲子, 公文 裕巳: 泌尿器感染症とバイオフィルム. 化学療法の領域 26: 71-8, 2010.
- 9) Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T: Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol*, 68: 223-40, 2008.
- 10) Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N: Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob*

- Agents Chemother, 55: 4469-74, 2011.
- 11) 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: 新規マイクロデバイスに形成された緑膿菌性バイオフィルムの共焦点レーザー走査型顕微鏡観察. Bacterial Adherence & Biofilm, 24: 69-73, 2010.
- 12) 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: 84-8, 2011.
- 13) 狩山玲子, 光畑律子, 上原慎也, 門田晃一, 公文裕巳: キャピラリーフローセルシステムにおける緑膿菌性バイオフィルムに対する抗菌薬の有効性評価. 緑膿菌感染症研究会講演記録 40: 135-8, 2006.
- 14) Kumon H, Ono N, Iida M, Nickel JC: Combination effect of fosfomycin and ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. Antimicrob Agents Chemother, 39: 1038-44, 1995.
- 15) Monden K, Ando E, Iida M, Kumon K: Role of fosfomycin in a synergistic combination with ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. J Infect Chemother, 8: 218-26, 2002.