

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）  
「歯科医療機関における効果的な院内感染対策の促進に関する研究」  
(H24-医療-指定-044)  
分担研究報告書

病院歯科における院内感染対策促進のための科学的な評価指標の分析

分担研究者 高柴 正悟  
岡山大学大学院・教授

研究要旨：医学の進歩によって易感染性状態の患者数が増加している。これらの患者に対する病院内の歯科医療の現場では、患者の全身状態に対応した感染対策を取ることが多い。その際の留意点は、医科歯科連携での検査データの共有と、歯科診療の際の標準予防策の実施である。感染予防策のレベルを標準的なものからどこまで上げる必要があるかは、患者の易感染性（場合によっては感染性も考慮）の程度によって異なるが、多数の患者への対応のための時間制約と医療経済の制約という因子を取り入れないと実効性が低下すると思われる。これらの諸因子を取り込んだ概念を作成し、今後の評価指標に科学性を与える検討課題とした。

#### A. 研究目的

病院歯科の現場では、医学の進歩の結果として癌患者や臓器移植患者など、さらには高齢者も含め、易感染性状態の患者数が増加している。こうした状況下での歯科診療における院内感染対策は、嫌気性菌の多い口腔細菌叢の存在で治療を行うことが多いので、非常に重要となる。

通常の歯科医院での問診では体調に関する十分な診療情報を得ることが困難であるが、病院内では医科歯科両方にわたる電子診療録を用いていることが多いので十分な診療情報を得ることが可能となる。ただし、病院間では電子診療録の様式が異なる場合や、同一病院内であっても医科と歯科の電子診療録が独立あるいは閲覧性に乏しい場合には、診療情報が不十分あるいは適時性に乏しいこともあるのが実情である。

こうした状況下での歯科診療では、一般開業歯科医院で対応しているような標準予防策が、院内感染の基本となる。すなわち、対応のための時間、労力、そして費用とのバランスがとれた、ある程度は確実な感染対策である。

本研究では、病院歯科における院内感染対策を促進するために考慮すべき因子を科学的に評

価する指標を検討した。歯科医療が関わる医療現場において、今後の院内感染対策を確実に行うための具体的なチェック項目となることを期待する。

#### B. 研究方法

##### 1. 本研究班員と研究協力者からの班会議報告からの因子の抽出

これまでの本研究班での会議で検討された内容に加えて、本研究班の前身の班における以前からの研究内容も含み、効果的な院内感染対策を促進するための諸因子を抽出した。

##### 2. 諸因子の分類

諸因子にのうち関連性が強いものを整理して8つのサブグループとした。さらに、それらを院外から患者や社会が対応するものと、院内において医療従事者が対応するものとの2系統に分類した。

##### 3. 諸因子へ与える社会からの圧力の分類

さらに、これら諸因子へ影響を与える社会的な

因子を4つに分類して、関連性を検討した。

#### 4. 諸因子を検討・実現するための関連研究の整理

本分担者の研究グループにおいて、本研究班とは独立しながらも、関連する内容で進行させている研究を整理した。

### C. 研究結果

#### 1. 効果的な院内感染対策を促進するための諸因子

関連する因子を抽出して、以下の8つに分類した(図の8つの小円)。なお、2系統は、図において左回りの流れと右回りの流れで示した。

##### 1) 患者の感染度の測定

- 特定物/非特定物の検出
- 検査方法

##### 2) 飛散感染物の検出

- 飛散範囲と活性
- 防止・除去の方法

##### 3) 特定病原性物の同定

- 病原生物の同定
- 病原物質の同定

##### 4) 使用機器類の滅菌等

- Disposable 製品の使用
- 歯科診療台 (Chair) の給水系

##### 5) 診療室内外の環境整備

- 空調・個室・整理整頓
- 廃棄物の処理方法

##### 6) 効果的医療制度の設定

- 周術期医療の充実
- 多職種医療チームの機動性向上

##### 7) 感染予防薬(材)の開発

- 低濃度・持続型の口腔ケア剤の開発
- 食品成分の応用

##### 8) 患者の防御力の把握

- 諸検査の実施
- 医科歯科連携でのデータ活用

#### 2. 諸因子へ影響を与える社会的な因子

これらの因子へ影響を与える社会からの圧力を整理した(図の4隅)。なお、近位にある因子は関連性がある。

##### 1) 患者と医療従事者における理解

##### 2) 医療従事者における行動

##### 3) 社会、特に患者からの要求

##### 4) 諸因子を反映する医療・社会制度

図

効果的な院内感染対策を促進するための諸因子



### D. 考察

今回分類した諸因子には、それぞれ細分化された小項目とそれを実現する具体的な方法が存在する。これらは、各因子への対応として個別に実施されてきた。担当する研究者や医療従事者、さらには行政担当者に及ぶ個人は、それぞれの理想

型を思い描いたに違いない。しかし、それだけでは、歯科医療における真の院内感染対策を効果的に実行することができない。昨今の Apple 社におけるコンピュータ、音楽プレーヤ、多機能携帯電話、さらにはスレート型情報端末と、それらを広く包括的に組み込んだクラウド型コンピュー

ティングによる人の行動支援に見られるような、全体観のある展開が院内感染対策には必要である。

本研究班分担研究者を始め、本研究班以外の研究者は、それぞれに院内感染対策に繋がる「各論」に終始していて、それを包括的に実行させる役割を担う担当者（指揮者）が不在ではなかろうか。本分担研究課題にある「院内感染対策促進のための科学的な評価指標の分析」は、まさにこの問題点を考えさせるものであった。

確かに本分担研究者も、以前からの研究を進展させて、今年度には様々な形で今回抽出した諸因子内の研究を進めてきた（G. 研究発表の項を参照）。しかし、どれも「効果的な院内感染対策の促進」へ向かいながらも、道半ばといったところである。それどころか、具体的な対応策を考えても、それらを社会へいかに浸透させるか、という悩みを常に抱えてきたのが実情である。

医療の進歩によって、歯科受診の患者の状態は一層多様化している。それに合わせて、歯科医療の現場における感染対策も多様化することが必要となっている。今後は、今回掲げた諸因子をもとに、歯科医療における院内感染対策の評価指標を、社会的な観点も入れて、開発していきたい。そのためにも、本研究を助成する厚生労働行政の政策に変化が出ることを望む。

#### E. 結論

歯科医療機関を取り巻く社会に存在する社会的因子を考慮しながら、院内感染対策促進のための科学的な評価指標に関わる8つの観点を整理した。

#### F. 健康被害情報

特に記載事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshihiko Soga, Yoshinobu Maeda, Mitsune Tanimoto, Takayuki Ebinuma, Hiroshi Maeda, Shogo Takashiba. Antibiotic sensitivity of bacteria on the oral mucosa after

hematopoietic cell transplantation. Support Care Cancer. 2013 Feb;21(2):367-8.

- 2) Chieko Kudo, Koji Naruishi, Hiroshi Maeda, Yoshimitsu Abiko, Takamune Hino, Masamitsu Iwata, Chiyoko Mitsuhashi, Shinya Murakami, Toshiyuki Nagasawa, Toshihiko Nagata, Satoshi Yoneda, Yoshiaki Nomura, Toshihide Noguchi, Yukihiro Numabe, Yorimasa Ogata, Tsutomu Sato, Hidetoshi Shimauchi, Kazuhisa Yamazaki, Atsutoshi Yoshimura, Shogo Takashiba. Assessment of use of plasma/serum IgG test to screen for periodontitis. Journal of Dental Research, 2012Dec;91(12):1190-5.
- 3) Tamaki Takahashi, Shigeo Muro, Naoya Tanabe, Kunihiko Terada, Hirofumi Kiyokawa, Susumu Sato, Yuma Hoshino, Emiko Ogawa, Kazuko Uno, Koji Naruishi, Shogo Takashiba, Michiaki Mishima. Relationship between Periodontitis-Related Antibody and Frequent Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. PLoS One. 2012;7(7):e40570.
- 4) Kazuya Tomikawa, Tadashi Yamamoto, Nobuyuki Shiomi, Masayuki Shimoe, Shoichi Hongo, Keisuke Yamashiro, Tomoko Yamaguchi, Hiroshi Maeda, Shogo Takashiba. Smad2 decelerates re-epithelialization during gingival wound healing. Journal of Dental Research. 2012 Aug;91(8):764-70.
- 5) Norihiro Sonoi, Yoshihiko Soga, Hiroshi Maeda, Koichi Ichimura, Tadashi Yoshino, Kazutoshi Aoyama, Nobuharu Fujii, Yoshinobu Maeda, Mitsune Tanimoto, Richard Logan, Judith Raber-Durlacher, Shogo Takashiba. Histological and immunohistochemical features of gingival enlargement in a patient with AML. Odontology, 2012 Jul;100(2):254-7.

##### 2. 学会発表 (Selected)

- 1) 山本大介, 大森一弘, 小林寛也, 富山高史, 久保克行, 成石浩司, 前田博史, 高柴正悟. ヒト歯肉線維芽細胞における IL-6/sIL-6R 誘導性 Angiogenin 産生に血管新生阻害薬 Terrein が及ぼす影響. 第 55 回日本歯周病学会春季学術大会, 2012, 日本, 札幌, 5/18/2012 ~5/19/2012.
- 2) 工藤値英子, 申偉秀, 三辺正人, 原井一雄, 郷家英二, 佐々木脩浩, 藤野健正, 前田博史, 高柴正悟. 医科歯科連携による未病対策推進を目的とした歯周病と動脈硬化性疾患の関連性に関する統計学的検討. 第 17 回日本未病システム学会総会, 2012, 日本, 金沢,

10/27/2012～10/28/2012.

- 3) 工藤値英子, 畑中加珠, 前田博史, 高柴正悟.  
歯周病原細菌感染度を指標に用いた口腔インプラント施術前後 10 年間の追跡調査研究の提案. 日本歯周病学会学術大会, 2012, 日本, 筑波, 9/23/2012.
- 4) 工藤値英子, 畑中加珠, 前田博史, 高柴正悟.  
インプラント周囲炎予防のための細菌学的検査による評価基準設定を視野に入れた長期コホート研究の提案. 日本口腔検査学会総会・学術大会, 2012, 日本, 東京  
8/25/2012～8/26/2012.
- 5) 工藤値英子, 新井英雄, 前田博史, 高柴正悟.  
全身疾患を有する慢性歯周炎患者に対して内科と連携して歯周治療を行った症例. 日本歯周病学会学術大会, 2012, 日本, 札幌,

5/18/2012～5/19/2012.

### 3. その他

- 1) 大学発ベンチャー企業「グライコポリマーサイエンス」設立; 科学技術振興機構報 第 888 号  
( <http://www.jst.go.jp/pr/info/info888/index.html> ); 日経ビジネス, No. 1661 : 33, 10/8/2012.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に記載事項なし。

厚生労働科学研究費補助金  
(一地域医療基盤開発推進研究事業一)  
(H24-医療-指定-044)

歯科医療機関における効果的な院内感染対策の促進に関する研究  
分担研究報告書

評価指標を利用した院内感染対策促進のための細菌学的検査の確立  
-歯科医療環境における薬剤耐性菌の生息状況調査-

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： 佐藤法仁、岡山大学教育研究プログラム戦略本部 URA 執務室・URA  
渡辺朱理、埼玉県立大学健康開発学科 口腔保健科学専攻・講師

研究要旨

近年、薬剤耐性菌による院内感染が深刻な問題となっている。歯科医院における薬剤耐性菌の生息状況についてデンタルユニット水および日本の家屋における代表的な病害微小昆虫であるタバコシバンムシ (*Lasioderma serricorne*) を対象に薬剤耐性遺伝子 (*mecA*、*vanA* および *vanB*、*blaVIM-2* および *blaIMP-1*) を指標に調査を実施した。

診療開始前のデンタルユニット水は水道水の水質管理基準として提唱されている従属栄養細菌数 2,000CFU/mL 以下また一般細菌数 100CFU/mL 以下という水質基準を満たしていないことが多かった。デンタルユニット水からは主な細菌種として *Novosphingobium* sp. や *Methylobacterium* sp. また日和見感染のおそれのある *Stenotrophomonas* 属細菌も一部検出された。院内感染で問題となる薬剤耐性菌、すなわち、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) や多剤耐性緑膿菌 (MDRP) や多剤耐性アシネトバクター (MDRA) などは、それらの薬剤耐性遺伝子 (*mecA*、*vanA* および *vanB*、また *blaVIM-2* および *blaIMP-1*) を指標にデンタルユニット水およびタバコシバンムシについて PCR 法によって検査した。その結果、今回の調査ではデンタルユニット水またタバコシバンムシからは薬剤耐性遺伝子は検出されなかった。

このような薬剤耐性菌を対象とする細菌検査を歯科医療環境モニタリング調査のひとつとして歯科医療環境整備や院内感染対策に役立てて、患者および歯科医療従事者のためのより安全で安心な歯科医療に貢献していきたい。

A. 研究目的

近年多剤耐性緑膿菌 (MDRP) や多剤耐性アシネトバクター (MDRA) が原因の院内感染によって入院患者の死亡事例が報告されて大きな社会問題となっている。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) やメタロ-β-ラクタマーゼ (*blaVIM-2*、*blaIMP-1*) を産生する薬剤耐性菌などは通常、院内感染対策において十分注意すべき細菌群である。また一方、デンタルユニット給水系の配管についてはバイオフィルム形成による細菌汚染

が懸念され、デンタルユニット水の水質管理が重要視されてきている。

そこで、今回、歯科診療室のデンタルユニット (スリーウェイシリッジ) からの歯科診療水における薬剤耐性菌について PCR 法を用いて調査を行った。

また、近年の地球温暖化や毎夏の猛暑などの影響で、アメリカニューヨークではここ数年にわたり家屋内での南京虫 (bedbugs) の大量発生が問題となっている。そこで、歯科医療環境調査として日本の家屋における代表的な病害微小昆虫

であるタバコシバンムシ (*Lasioderma serricirne*) の生息状況を調べた。あわせてタバコシバンムシにおける薬剤耐性菌の有無についても PCR 法を用いて調査を進めた。

## B. 研究方法

1. 検査対象： デンタルユニット水は、某歯科診療室のデンタルユニット 6 台のスリーウェイシリンジから、診療終了時から休日をはさんで 3 日半の休診後の診療開始前に採取した。

2. 細菌培養検査： 従属栄養細菌の培養は、R2A 培地で 25°C、7 日間培養し、また一般細菌の培養は、普通寒天平板培地で 37°C、4 日間培養した。培養後それぞれの寒天平板培地に増殖したコロニー数を計測した。

3. 歯科診療室におけるタバコシバンムシ生息状況調査： 歯科診療所 14 軒 (A 県; 8 軒、B 県; 4 軒、C 県; 1 軒、D 県; 1 軒) の 1 診療室あたり 3 ヶ所にタバコシバンムシトラップ (NEW SERRICO: 富士フレイバー社製) を仕掛け、1 ヶ月ごとにトラップを回収して、2 ヶ月間 (平成 23 年 8 月と 9 月) にわたって、タバコシバンムシの生息状況調査を実施した。あわせて一般家庭 3 軒 (A 県) の台所についても同様に調査した。

4. 薬剤耐性菌の PCR 検査： 試料水 50mL を 1,200×g で 30 分間遠心沈殿して、その沈殿からの DNA 抽出は InstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いて調製した。1 ヶ月間、歯科診療所 1 軒あたりで捕集されたタバコシバンムシ 8 匹をランダムにまとめ、それらからの DNA 抽出は InstaGene Matrix とともにディスポーザブル・ホモジナイザーを用いてすり潰して調製した。薬剤耐性菌は MRSA については *mecA*、VRE については *vanA* および *vanB*、さらにメタロ-β-ラクタマーゼ産生薬剤耐性菌については *blaVIM-2* および *blaIMP-1* のそれぞれの薬剤耐性遺伝子を増幅する特異的な PCR プラ

イマーを用いて PCR 法で増幅し、増幅 DNA 断片の有無をアガロース電気泳動で確認することによって検査した。

## C. 研究結果

### 1. デンタルユニット水の細菌検査：

日常の歯科診療終了後、3 日半の給水停止によって、診療開始時点ではデンタルユニット水における従属栄養細菌数は 41,300CFU/mL~207,000 CFU/mL であり、また一般細菌は 850CFU/mL~62,200 CFU/mL であった。いずれも水道水の水質管理基準として提唱されている従属栄養細菌数 2,000CFU/mL 以下、また一般細菌 100CFU/mL 以下という水質基準を満たしていなかった。デンタルユニット給水系からの細菌種は、今回も *Novosphingobium* sp. や *Methylobacterium* sp. であり、日和見感染の原因ともなりえる *Stenotrophomonas* sp. も同定された。

また、院内感染の原因細菌として注目されている MRSA や VRE をはじめとする薬剤耐性菌をそれぞれの薬剤耐性遺伝子を指標に PCR 法で検査すると今回の調査ではいずれもデンタルユニット水からは検出されなかった (図 1)。

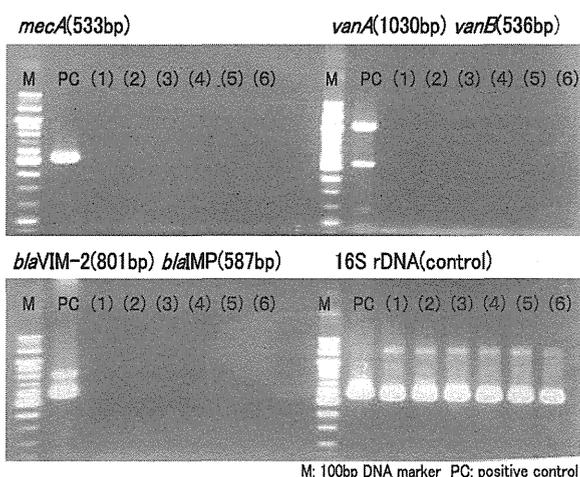


図1. デンタルユニット水における薬剤耐性遺伝子の検出

### 2. 歯科診療室におけるタバコシバンムシ生息調査：

一昨年調査した A 県にある某歯科診療室の 3 ヶ所を今年と比較すると昨年の猛暑の影響か、タバコシバンムシの捕集匹数は増加していた (図 2)。

歯科診療所 14 軒におけるタバコシバンムシ捕集総匹数

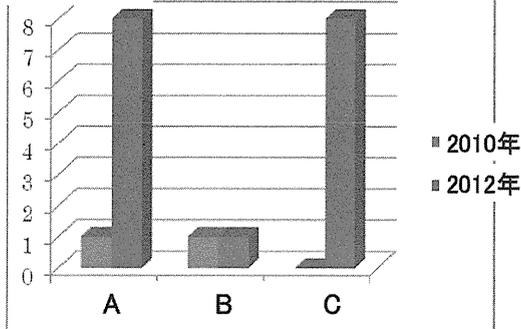


図2. 某歯科診療室におけるタバコシバンムシ捕集結果—2010年9月と2012年9月との比較—

ムシの捕集結果を図3-1に示す。2ヶ月間で、0匹；4軒、5匹以下；1軒、10～20匹；4軒、21～30匹；1軒、31～40匹；1軒、41～50匹；1軒、51匹以上；2軒であった。一般家庭台所の平均は23匹であり、歯科診療所4軒（A県1軒、B県2軒、D県1軒）がそれを上回った。また1軒（A県）の歯科診療所では8月、9月と屋内昆虫を捕食しようとしたのか小さなヤ

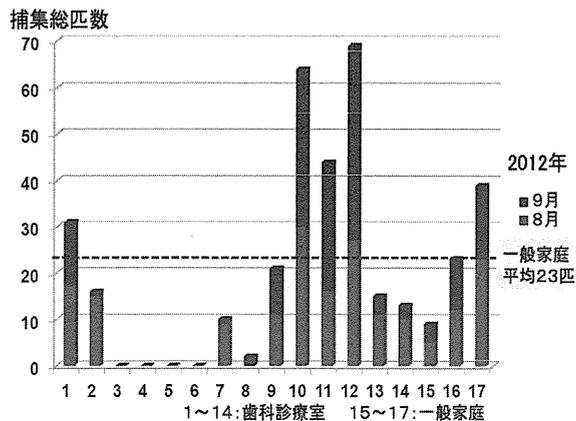


図3-1. 歯科診療室におけるタバコシバンムシ捕集結果  
モリが1匹ずつトラップに捕集されていた（図3-2）。

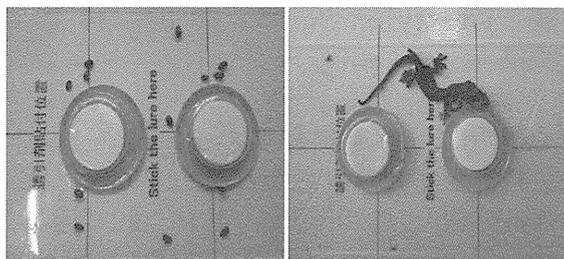


図3-2. タバコシバンムシトラップでの捕集状況

昆虫が薬剤耐性菌を保菌してそれを媒介する可能性を示唆する報告を散見する（Emerg Infect Dis. 2011;17(6): 1132-1134., Sci Total Environ. 2009;407(8): 2701-10., Epidemiol. Infect. 1991;107, 181-187.）。

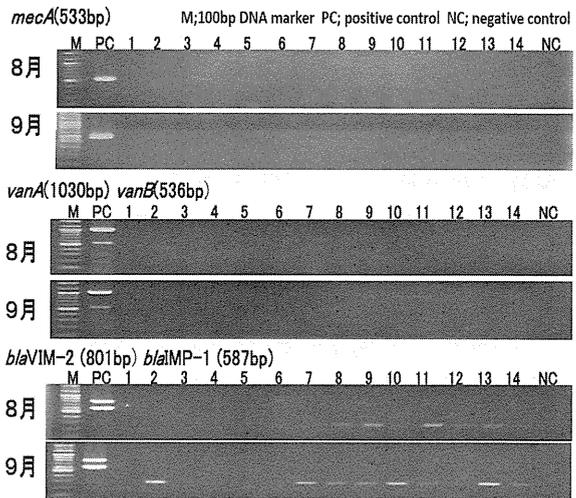


図4. タバコシバンムシにおける薬剤耐性遺伝子の検出

そこで、タバコシバンムシは院内感染対策で問題となるようなMRSAやVREなどの薬剤耐性菌を保菌しているか否かについて薬剤耐性遺伝子を指標にPCR法で調べた。その結果、今回捕集したタバコシバンムシからは、*mecA*、また *vanA* および *vanB*、さらに *blaVIM-2* および *blaIMP-1* のいずれの薬剤耐性遺伝子も検出されなかった（図4）。

#### D. 考察

今回の調査でも診療開始時のデンタルユニット初流水はいずれも水道水の水質基準を満たしていないことが判った。さらに今回の調査では、院内感染で問題となるような耐性菌についてその薬剤耐性遺伝子（*mecA*、さらに *vanA* および *vanB*、また *blaVIM-2* および *blaIMP-1*）を指標にPCR法で検査した。

その結果、薬剤耐性菌は診療開始時のデンタルユニット初流水からは検出されなかったが、主な細菌種として、*Novosphingobium* sp. や *Methylobacterium* sp. また *Stenotrophomonas* sp. などが同定

された。これらの菌は、デンタルユニット給水系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のであろう。それぞれの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とならないが、歯科診療機会が近年増加している高齢者、さらにはインプラントなど高度歯科医療においては、日和見感染の危険性もあり、デンタルユニット水に関して十分な管理と対策が必要であらう。

今後もデンタルユニット給水系における細菌特に今回確立した PCR 法を用いての薬剤耐性菌の生息状況について引き続きモニタリング調査をしてゆきたい。

さらに、今回、地球温暖化また節電の影響で国内でも発生が懸念されている病害微小昆虫について、まず、タバコシバンムシ (*Lasioderma serricirne*) の歯科診療室における生息実態調査を実施し、あわせてその昆虫が保有する薬剤耐性菌の有無についても PCR 法で調べた。

今回の調査では一般家庭の台所よりもタバコシバンムシが多く捕集された歯科診療所が4軒見受けられた。歯科医療環境の清掃には日頃から十分に心がけていると思うが、目視確認だけではなかなか行き届かないところもあり、今回のタバコシバンムシ調査が何らかの一助になればと思う。

また今回捕集したタバコシバンムシからは院内感染対策で問題となるような薬剤耐性菌は検出されなかったが、歯科医院における医療環境調査を院内感染対策に繋げることができるように今後も研究を進めたい。

## E. 結論

診療開始前のデンタルユニット水は水道水の水質基準を満たしていないことが多い。院内感染対策として、日々の診療開始前における十分な通水（フラッシング）や細菌検査を含めた定期的な水質管理、モニタリングが重要である。デンタルユニット水における薬剤耐性菌についても今後、注意し

ていく必要がある。また歯科医療環境の清掃度のひとつの指標としてタバコシバンムシ生息状況調査を今後も引き続き検討してゆきたい。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

渡辺朱理, 佐藤法仁, 高久悟, 苔口進: 日米の歯科衛生士養成課程における感染予防教育の比較 — 質問紙法による認識度と習熟度の検討 —. 日本歯科衛生教育学会雑誌 4 巻, 1 号, 2013 年 (印刷中).

渡辺朱理, 佐藤法仁, 苔口進: 歯科衛生士の清潔感に関する患者の意識調査. 平成 24 年度全国大学歯科衛生士教育協議会雑誌 2 号, 2013 年 (印刷中).

Maeda H, Hirai K, Mineshiba J, Yamamoto T, Kokeyuchi S, Takashiba S.: Medical microbiological approach to Archaea in oral infectious diseases. Japanese Dental Science Review. 2013 (in press).

佐藤法仁: シリーズ院内感染対策塾 第 5 回 滅菌・消毒・洗浄の応用 (1). ZOOM UP, 135, 34-35, 2012 年 8 月.

佐藤法仁: シリーズ院内感染対策塾 第 6 回 滅菌・消毒・洗浄の応用 (2). ZOOM UP, 136, 34-35, 2013 年 2 月.

佐藤法仁: 感染制御学ノート vol.4 真菌. DH style, Vol.6, NO.69, 14-16, 2012 年 4 月.

佐藤法仁: 感染制御学ノート vol.5 A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス. DH style, Vol.6, NO.70, 14-16, 2012 年 5 月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 6 B型肝炎ウイルス. DH style, Vol. 6, NO. 71, 14-16, 2012年6月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 7 C型肝炎ウイルス. DH style, Vol. 6, NO. 72, 14-17, 2012年7月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 8 黄色ブドウ球菌. DH style, Vol. 6, NO. 73, 14-17, 2012年8月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 9 風疹ウイルス. DH style, Vol. 6, NO. 74, 14-17, 2012年9月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 10 麻疹ウイルス. DH style, Vol. 6, NO. 76, 14-18, 2012年10月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 11. ヒト免疫不全ウイルス 前編. DH style, Vol. 6, NO. 77, 14-18, 2012年11月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 12 ヒト免疫不全ウイルス 中編. DH style, Vol. 6, NO. 78, 14-17, 2012年12月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 13 ヒト免疫不全ウイルス 後編. DH style, Vol. 7, NO. 79, 12-16, 2013年1月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 14. ノロウイルス. DH style, Vol. 7, NO. 80, 12-17, 2013年2月.

佐藤法仁：感染制御学ノート vol. 15. ノインフルエンザウイルス 前編. DH style, Vol. 7, NO. 81, 12-16, 2013年3月.

## 2. 学会発表

渡辺朱理, 高久悟, 佐藤法仁, 苔口進： 歯科臨床実習用デンタルユニット給水系に

おける細菌生息状況調査. 日本歯科衛生学会第7回学術大会 (岩手県, 盛岡市) 2012年9月.

佐古真一, 狩山玲子, 山本満寿美, 石井亜矢乃, 和田耕一郎, 上原慎也, 渡辺豊彦, 公文裕巳, 光畑律子, 苔口進： 尿路由来メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能および分子疫学的検討. 第60回日本化学療法学会西日本支部総会, 第55回日本感染症学会中日本地方会学術会議, 第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会 (福岡県, 福岡市) 2012年11月.

奥井明美, 曾我賢彦, 山中玲子, 森田学, 苔口進： 口腔粘膜上細菌と心内膜炎原因菌の同一性を遺伝子レベルで検討した一症例. 日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会 (広島県, 広島市) 2012年11月.

Watanabe A, Satoh N, Tamaki N, Kokeguchi S: Infection Control Awareness among American and Japanese Dental Hygienist Students. 91th General Session & Exhibition of the IADR (Seattle, USA). March, 2013.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Norihiko Kanaguchi, Naoki Narisawa, Tatsuro Ito, Yosuke Kinoshita, Yasuka Kusumoto, Osamu Shinozuka and Hidenobu Senpuku	Effects of salivary protein flow and indigenous microorganisms on initial colonization of <i>Candida albicans</i> in an <i>in vivo</i> mode.	BMC Oral Health	12	36	2012
Xi Zhang and Hidenobu Senpuku	Dynamic changes in the initial colonization of <i>Actinomyces naeslundii</i> and <i>Streptococcus gordonii</i> using a new animal model.	Jpn J Infect Dis.	66	11-16	2013
Keitaro Satoh, Takanori Narita, Miwako Matsuki-Fukushima, Ken Okabayashi, Tatsuro Ito, Hidenobu Senpuku, Hiroshi Sugiya	E2f1-deficient NOD/SCID mice have dry mouth due to a change of acinar/duct structure and the down-regulation of AQP5 in the salivary gland.	European Journal of Physiology, Pflugers Arch.	465	271-281	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
<u>Hidenobu Senpuku</u>	A quick statistically accurate diagnosis system using salivary IgA for oral disease. Chapter 2	Book: Current Trends in Biotechnology, Editted by Tiwari Santosh. Lambert Academic Publishing, Germany.	7	pp27-43	2012
Chieko Kudo, Koji Naruishi, Hiroshi Maeda, Yoshimitsu Abiko, Takamune Hino, Masamitsu Iwata, Chiyoko Mitsuhashi, Shinya Murakami, Toshiyuki Nagasawa, Toshihiko Nagata, Satoshi Yoneda, Yoshiaki Nomura, Toshihide Noguchi, Yukihiro Numabe, Yorimasa Ogata, Tsutomu Sato, Hidetoshi Shimauchi, Kazuhisa Yamazaki, Atsutoshi Yoshimura, <u>Shogo Takashiba</u>	Assessment of use of plasma/serum IgG test to screen for periodontitis.	Journal of Dental Research,	91	1190-1195	2012

Kazuya Tomikawa, Tadashi Yamamoto, Nobuyuki Shiomi, Masayuki Shimoe, Shoichi Hongo, Keisuke Yamashiro, Tomoko Yamaguchi, Hiroshi Maeda, <u>Shogo Takashiba</u>	Smad2 decelerates re-epithelialization during gingival wound healing.	Journal of Dental Research	91	764-770	2012
Norihiro Sonoi, Yoshihiko Soga, Hiroshi Maeda, Koichi Ichimura, Tadashi Yoshino, Kazutoshi Aoyama, Nobuharu Fujii, Yoshinobu Maeda, Mitsune Tanimoto, Richard Logan, Judith Raber-Durlacher, <u>Shogo Takashiba</u>	Histological and immunohistochemical features of gingival enlargement in a patient with AML.	Odontology	100	254-257	2012
Tamaki Takahashi, Shigeo Muro, Naoya Tanabe, Kunihiko Hirofumi Terada, Hirofumi Terada, Kiyokawa, Susumu Sato, Yuma Hoshino, Emiko Ogawa, Kazuko Uno, Koji Naruishi, <u>Shogo Takashiba</u> , Michiaki Mishima	Relationship between Periodontitis-Related Antibody and Frequent Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.	PLoS One	7	e40570	2012
Yoshihiko Soga, Yoshinobu Maeda, Mitsune Tanimoto,	Antibiotic sensitivity of bacteria on the oral mucosa after hematopoietic cell transplantation.	Support Care Cancer.	21	367-368	2013

Takayuki Ebinuma, Hiroshi Maeda, Shogo Takashiba					
渡辺朱理, 佐藤法 仁, 苔口進	歯科衛生士の清潔感に関する患者 の意識調査	日本歯科衛生 教育学会雑誌	4	(印刷中)	2013
Maeda H, Hirai K, Mineshiba J, Yamamoto T, Kokeguchi S, Takashiba S	Medical microbiological approach to Archaea in oral infectious diseases.	Japanese Dental Science Review	68	(in press).	2013
佐藤法仁	シリーズ院内感染対策塾 第5回 滅菌・消毒・洗浄の応用(1)	ZOOM UP	135		2012
佐藤法仁	シリーズ院内感染対策塾 第6回 滅菌・消毒・洗浄の応用(2)	ZOOM UP	136	34-35	2013
渡辺朱理, 佐藤法 仁, 高久悟, 苔口進	日米の歯科衛生士養成課程におけ る感染予防教育の比較 —質問紙 法による認識度と習熟度の検討—	平成24年度全 国大学歯科衛 生士教育協議 会雑誌	2	(印刷中)	2013

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Effects of salivary protein flow and indigenous microorganisms on initial colonization of *Candida albicans* in an *in vivo* model

Norihiko Kanaguchi<sup>1,3</sup>, Naoki Narisawa<sup>3</sup>, Tatsuro Ito<sup>2,3</sup>, Yosuke Kinoshita<sup>1,3</sup>, Yasuka Kusumoto<sup>1,3</sup>, Osamu Shinozuka<sup>1</sup> and Hidenobu Senpuku<sup>3\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Candida albicans* is a dimorphic fungus that is part of the commensal microbial flora of the oral cavity. When the host immune defenses are impaired or when the normal microbial flora is disturbed, *C. albicans* triggers recurrent infections of the oral mucosa and tongue. Recently, we produced NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice that show hyposalivation, decrease of salivary protein flow, lack IgA and IgG in saliva, and have decreased NK cells. Our objective was to characterize *C. albicans* infection and biofilm formation in mice.

**Methods:** NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice were used as an animal model for *C. albicans* infection. *C. albicans* yeast and hyphal forms solutions were introduced in the oral cavity after disinfection by Chlorhexidine.

**Results:** The numbers of *C. albicans* colonized and decreased in a time-dependent manner in NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> after inoculation. However, the colonization levels were higher in NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> than NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice. In the mice fed 1% sucrose water before inoculation, *C. albicans* sample was highly contaminated by indigenous microorganisms in the oral cavity; and was not in the mice fed no sucrose water. The colonization of *C. albicans* was not influenced by the contamination of indigenous microorganisms. The hyphal form of *C. albicans* restricted the restoration of indigenous microorganisms. The decreased saliva in NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> did not increase the colonization of *C. albicans* in comparison to NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> mice. We suggest that the receptor in saliva to *C. albicans* may not be sufficiently provided in the oral cavity of NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice.

**Conclusion:** The saliva protein flow may be very important for *C. albicans* initial colonization, where the indigenous microorganisms do not affect colonization in the oral cavity.

**Keywords:** *Candida albicans*, NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice, Saliva, Colonization, Sucrose

## Background

*Candida* spp. are human commensals commonly colonizing human mucosal surfaces and can participate in biofilm formation on mucosal and cutaneous surfaces as well as on device surfaces, e.g., dentures, venous catheters, and urinary catheters [1-7]. However, under certain conditions, the fungus causes a variety of infections from mild mucosal infections to life-threatening invasive candidiasis [8]. Many manifestations of candidiasis are associated with the formation

of biofilms on host tissues (e.g., oral thrush) and on indwelling medical devices (central venous catheter-associated candidemia) [9]. A clinically significant characteristic of microbial biofilms is their enhanced resistance to antimicrobial drug therapies [10-12].

*Candida albicans* is commensal on human mucosal surfaces and is one of the most important nosocomial infections of humans. *C. albicans* is the most common cause of various forms of candidiasis [13]. Under conditions of immune dysfunction, colonizing *C. albicans* can become an opportunistic pathogen causing recurrent mucosal infections of the oral cavity and vagina in immune-compromised hosts such as the elderly and HIV-positive patients [14,15]. *C. albicans* is a pleiomorphic fungus

\* Correspondence: hsenpuku@nih.go.jp

<sup>3</sup>Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

having the ability to transition between cellular yeast and filamentous forms essential for virulence; therefore filamentous forms constitute a central component in *C. albicans* pathogenesis. Various models have been established to study candidiasis, including *Candida*-epithelial cell interactions using immortalized human epithelial cell lines in tissue culture [16-18] where *C. albicans* adheres to the epithelial cells of the oral mucosa and also invades these cells. Invasion into the epithelial cell limit of the oral mucosa is characteristic of both human and experimental animal models of oropharyngeal candidiasis [19-22].

A recent investigation developed NOD/SCID background E2F-1 deficient mice (NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup>) (T and B cells do not develop where the E2F-1 function loss in the NOD/SCID background mice do not have an auto-reactive response) [23]. The NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice have decreased saliva volume, lack sIgA and IgG in the saliva, as compared with NOD.*e2f1*<sup>+/+</sup> mice. This mouse has decreased NK cells as compared with SCID mice and may be a useful animal model for studying oral infection, colonization, and biofilm formation. Further, human tissue grafts can be used in this mouse. These mice have long survival because they do not develop systemic diseases such as Insulin Dependent Diabetes Mellitus and Sjögren's Syndrome in comparison to the parent strain NOD.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice. Recently, we found these mice are highly susceptible to dental caries pathogen; *Streptococcus mutans* colonization when NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice are pre-treated with human saliva or sIgA using a low concentration (1%) sucrose supplement; *S. mutans* biofilm formation occurred when the mice were supplied 1% sucrose water and a non-sucrose diet [24]. Therefore, these mice may be a useful animal model for *C. albicans* infections in the oral cavity because they have decreased saliva volume and are impaired in immune activity by T, B cells and NK cells.

Mammalian infection models, in particular mouse models, are commonly used to study host-pathogen interaction of human pathogens. Murine models for both superficial and systemic *C. albicans* infections have been developed and are widely used to study pathogenesis and to determine the virulence of defined *C. albicans* mutants [25,26]. Saliva includes various anti-microbial agents and is likely to play important roles in resistance to infection by *C. albicans* in the oral cavity. Immune-deficient mice such as Rag1<sup>-/-</sup> and CB-17.SCID mice have been used as an infection model for *C. albicans* [27]. However, very little is known about the contribution of saliva in initiation of *C. albicans* colonization and mucosal infection in the oral cavity using the mouse model. In this study, we investigated the initial colonization of *C. albicans* in the animal model using NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> and NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice.

## Methods

### Strains and culture conditions

The strain used was *C. albicans* SC5314. *C. albicans* was incubated for 24 h at 37°C in Yeast Peptone Dextrose (YPD; 2% Bacto peptone, 2% dextrose and 1% yeast extract, Becton Dickinson, Sparks, MD) broth before the beginning of each experiment. The yeast form of *C. albicans* was predominant in culture with YPD overnight; whereas the mycelial form occurred in RPMI1640 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY) with 5% FBS in overnight culture (Figure 1A). The two cell types were used to inoculate the oral cavity.

### Animals

Heterozygous  $\Delta$ E2F-1 NOD/SCID mice were bred to generate homozygous  $\Delta$ E2F1 NOD/SCID mice. Three strains of NOD/SCID mice (*e2f1* <sup>+/+</sup>, <sup>+/-</sup> and <sup>-/-</sup>) were identified using PCR [23]. All mice used were female, 4 months of age, and were maintained in accordance with the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Institute of Infectious Diseases. Experimental protocols (#211125) were approved by the National Institute of Infectious Diseases Animal Resource Committee.

### Bacterial sampling and colony-forming unit (CFU) estimates

Bacterial inoculation, sampling, and CFU estimates were performed using procedures and conditions described previously [28-30]. *C. albicans* yeast and hyphal forms were cultured in YPD and RPMI1640 with 5% FBS broth overnight and washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS). In our previous study we demonstrated *S. mutans* colony counts were significantly higher than that of other streptococci (i.e. *S. sanguis*, *S. sobrinus*, and *S. salivarius*) in mice that ingested 1% sucrose in water one day before inoculation [28]. In the same way, NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> and NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice were also given drinking water containing 1% sucrose (less than the usual concentration in juice) one day prior to *C. albicans* inoculation to encourage the early adherence of *C. albicans* in conditions resembling a natural oral environment. In contrast, drinking water (no sucrose) was used as a control. Chlorhexidine (CHX; 0.2%) soaked sterile cotton swabs were used to disinfect the oral cavities of the mice including teeth, tongue, and mucosal surfaces. The cavity was immediately washed with sterile PBS. This disinfection was confirmed as few bacterial cells were observed in mice at 30, 60, and 90 min after the inoculation. *C. albicans* yeast and hyphal forms solutions were introduced to the oral cavities of three females at 4 months of age at a final concentration of  $5 \times 10^9$  CFU in 250  $\mu$ l of PBS during a 1 min period. Following inoculation, samples were collected from the tongue and buccal mucosa with a

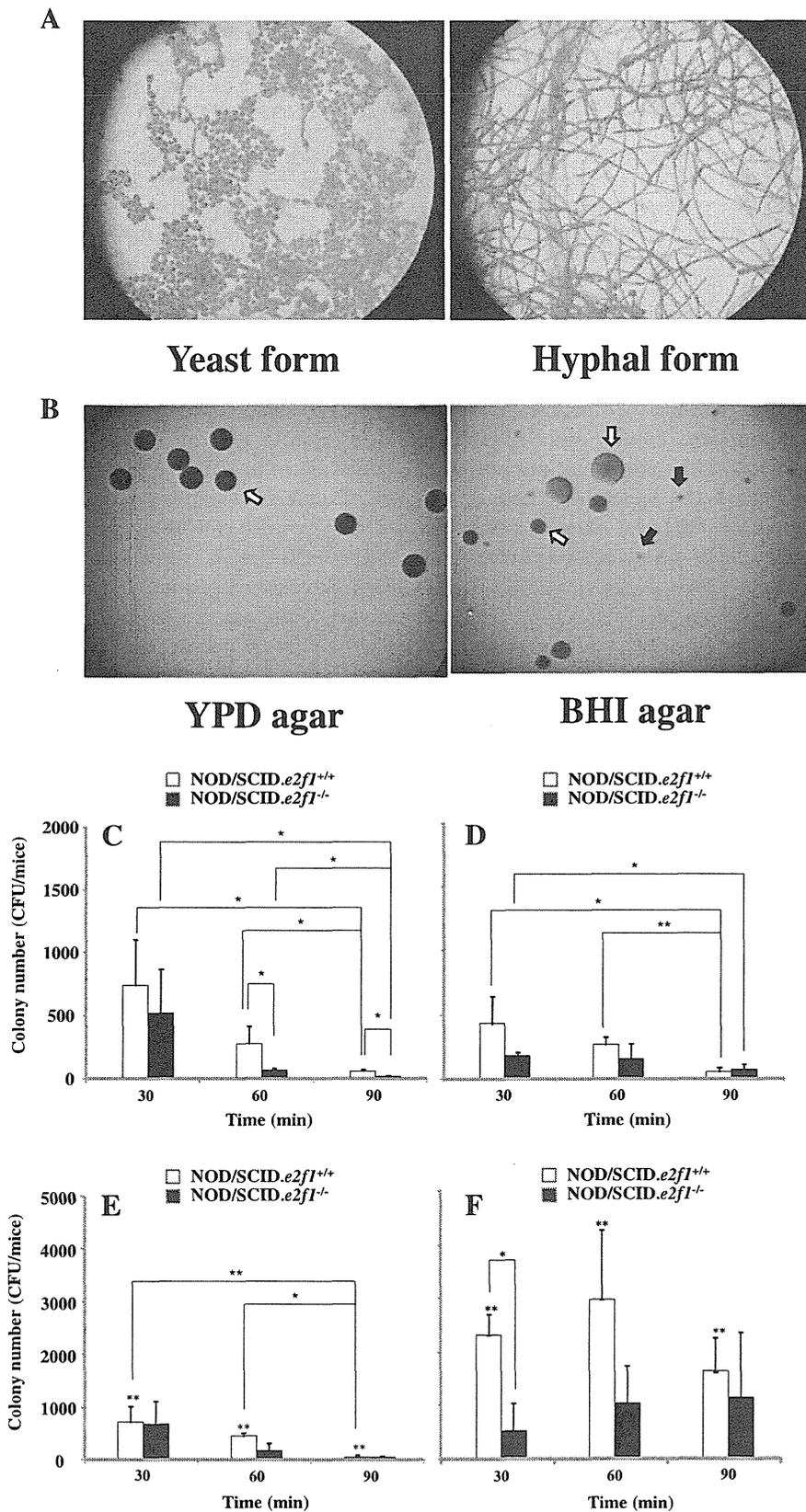


Figure 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Figure 1 Observation of *C. albicans* yeast and hyphal forms, and colony numbers after inoculation.** *C. albicans* yeast and hyphal forms were taken pictures in microscope after incubation of them in YPD and RPMI1640 with 5% FBS (A). The colonization was observed on the YPD agar and BHI agar plates poured swab samples from oral cavity of NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice fed 1% sucrose water at 60 min after the inoculation (B). White and black arrow indicated *C. albicans* and indigenous microorganism colony respectively. These colonies were taken pictures in the stereoscopic microscope. Data were representative in three independent assays. Samples were swabbed from the oral cavities of four 4-month-old female NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> and NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice at 30, 60, and 90 minutes after inoculation using the yeast form. Samples swabbed in mice fed water (C) or 1% sucrose water (D) overnight before inoculation were poured on YPD agar. Samples swabbed in mice fed water (E) or 1% water (F) before inoculation were poured on BHI agar. CFU data were obtained from three independent experiments with four mice from each strain. Values are expressed as the means ± standard deviations (SDs) of the data. Asterisks show significant differences (\**P* < 0.05) in C and D and significant differences (\*\* < 0.05) between water (E) and 1% sucrose water (F) for drinking.

sterile cotton ball at 30, 60 and 90 min after the inoculation and then dipped in 2 ml of PBS. The samples in sterile PBS were sonicated using ultrasonic dispersion (power output, 60 W) for 10 s, and then poured onto YPD agar to determine *C. albicans* colony number and on BHI agar for *C. albicans* and indigenous microorganism colony number (Figure 1B). CFUs were determined by counting colonies on the YPD agar after 24 hours and on BHI agar plates after 48 h using aerobic incubation at 37°C.

#### Statistical analysis

All data were analyzed using the Statistical Package for SPSS for Windows (version 100, Chicago, IL). The Student's t-test was used to compare control data and the data for *C. albicans* after incubation. \* indicate *P*-values less than 0.05, and \*\* at 0.01 were considered to be significant.

## Results

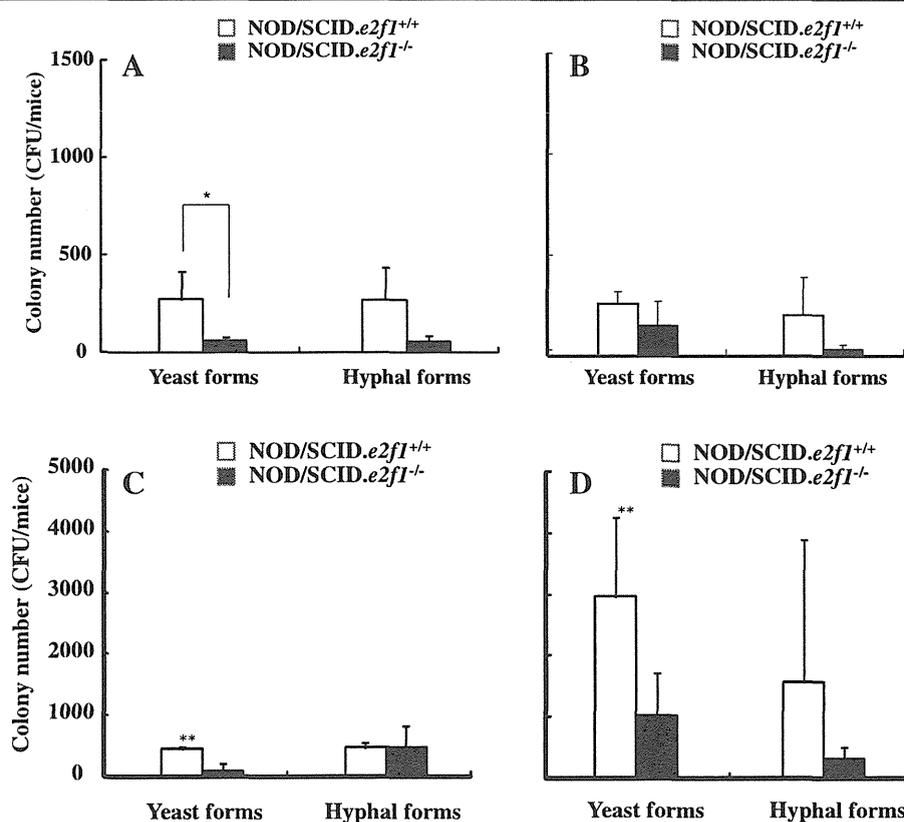
### Effects of decreasing saliva and indigenous oral microorganisms on the *C. albicans* initial colonization

Saliva is thought to play a significant role in the attachment and colonization of *C. albicans* on tooth and oral mucosa. We evaluated the effects of different volumes of saliva on *C. albicans* colonization using NOD/SCID wild type and NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice. The CFU numbers of *C. albicans* yeast form colonized in the oral cavity after disinfection by chlorhexidine. *C. albicans* colonization in both mice were significantly decreased from 30 min to 90 min after inoculation in NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> mice when they were treated with or without sucrose water (Figure 1C and D). The colonization was also decreased; but these reductions were not significantly different in NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice as compared to NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> mice. *C. albicans* CFU numbers were significantly lower in NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice than those in NOD/SCID wild type mice fed water after 60 and 90 min post inoculation (Figure 1C). Therefore, decreasing saliva is associated with reduced colonization of *C. albicans*. However, the significant differences between NOD/SCID wild and NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice disappeared by including sucrose in the drinking water

(Figure 1D). YPD was used as a selective medium for *C. albicans* because there was a possibility that some indigenous microorganisms in mice may contaminate the swabbed sample after disinfection by Chlorhexidine. BHI agar plating was also used to confirm contamination levels by indigenous microorganisms. The total number of *C. albicans* and indigenous microorganisms on the BHI agar were similar to those on the YPD plates in the NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> mice with no-sucrose drinking water and the time-dependent decreasing was also similar in colony numbers in YPD to those in BHI (Figure 1C and Figure 1E). However, the total number of *C. albicans* and indigenous microorganisms increased significantly in the sucrose-water as compared with no-sucrose water in NOD/SCID.*e2f1*<sup>+/+</sup> mice (Figure 1E and F). However, there were no significant differences among samples at each sampling time in the drinking of sucrose water. In the case of NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice, a few indigenous bacteria were increased significantly by adding of sucrose in the drinking water, and the colonization did not show significant differences among sampling times (Figure 1E and F). In contrast, with sucrose in the drinking water, many indigenous microorganisms were found because CFU numbers on BHI were significantly higher than those on YPD using the same sample (Figure 1F). Therefore, sucrose helps time-dependent restoration of indigenous microorganisms after disinfection by chlorhexidine but does not affect increased infection by *C. albicans*. Further, decreasing saliva may not help the colonization of *C. albicans* or restoration of indigenous bacteria in NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mouse system.

### Comparison of colonization between yeast and hyphal forms in mouse oral cavity

In severe infection by *C. albicans*, the hyphal form has very important roles as compared to the yeast form. Therefore we tested oral colonization of the hyphal form compared to the yeast form at 60 min after inoculation. The colonizations of *C. albicans* were similar in the hyphal and yeast forms in both mice (Figure 2A and B). The colonization of total microorganisms was significantly higher with sucrose drinking water than with no-sucrose water in the yeast form, but there was no



**Figure 2 Comparison of the yeast form and hyphal form in colony numbers of *C. albicans*.** Samples swabbed from the oral cavities at 60 minutes after inoculation of the yeast form or hyphal form in four 4-month-old female NOD/SCID.e2f1<sup>+/+</sup> and NOD/SCID.e2f1<sup>-/-</sup> mice fed water (A) or 1% sucrose water (B) overnight were poured on YPD agar. Other samples in mice fed water (C) or 1% sucrose water (D) were poured on BHI agar. CFU data were obtained from three independent experiments with four mice from each strain, and values are expressed as the means ± standard deviations (SDs) of the data. Asterisks show significant differences (\**P* < 0.05) in A and significant differences (\*\* < 0.05) between water (C) and 1% sucrose water (D) for drinking.

difference in the hyphal form in NOD/SCID.e2f1<sup>+/+</sup> mice (Figure 2C and D). The decreased saliva volume in NOD/SCID.e2f1<sup>-/-</sup> mice and hyphal form in both mice did not induce the effects of sucrose drinking water on the ratio of the yeast form in NOD/SCID.e2f1<sup>+/+</sup> mice. Therefore, the saliva volume and hyphal form of *C. albicans* may restrict the restoration of indigenous microorganisms.

## Discussion

The colonization of *C. albicans* depends on several factors: the acquisition or entry of cells into the oral cavity, the attachment and growth of these cells, the penetration of tissues, and the removal of cells from the oral cavity. In this study, the NOD/SCID.e2f1<sup>-/-</sup> mice with decrease of saliva showed negative colonization of *C. albicans* as compared with NOD/SCID wild type mice. On the tooth surface coated with a salivary pellicle microbial adherence interactions may involve adsorbed saliva molecules. The saliva pellicle increases the adherence of *C. albicans* cells to HA beads [31]. Other investigators

previously have shown the presence of serum and salivary pellicles can help *C. albicans* colonization on acrylic strips and denture lining materials [32,33]. Therefore, we speculate the NOD/SCID mice produce saliva containing receptors to bind to *C. albicans* and create a saliva-exposing environmental mucosal surface in the oral cavity.

In contrast, innate defenses include the epithelial barrier and anti-candidal compounds in saliva such as lysozyme [34], histatins [35], lactoferrin [36], and calprotectin [37,38]. Innate host defenses are critical in the maintenance of oral health. Saliva includes lysozyme, lactoferrin, and histatins that are thought to be the three major non-immunological antimicrobial proteins to modulate *Candida* populations in the oral cavity [39]. However, the decreased saliva negatively modulated *C. albicans* populations in this study. In our previous study, the saliva from NOD/SCID.e2f1<sup>+/+</sup> and e2f1<sup>-/-</sup> mice was characterized in protein concentration/ml, amylase activities, and protein concentration per min/ml [24]. There were no significant differences in protein