

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08739

研究課題名(和文)人工呼吸器管理患者における高感度濁度計の口腔清潔度評価としての有用性の検討

研究課題名(英文) Examination of usefulness of turbidity meter for oral cleanliness evaluation in patients with ventilator management

研究代表者

井川 加織 (Igawa, Kaori)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90423722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：人工呼吸器関連肺炎(VAP)は、死亡率24～76%といわれ、その起炎菌の多くが口腔内細菌由来であることから、口腔ケアによる予防が期待されている。口腔ケアを行う際の口腔内洗浄液の濁り(濁度)を濁度計で測定することにより、簡易的に口腔の潜在的な感染症のリスクを検査および評価できるかを検討した。対象症例数は12例と少ないものの、12例中口腔衛生状態が最も悪く、口腔内洗浄液の最も濁度が高い1症例においてVAP発症を認め、入院・挿管1日目に16S rRNA遺伝子シーケンスによる細菌叢解析にて検出された口腔内洗浄液内の細菌は入院28日目の血液培養検査で検出されたものと一致した。

研究成果の概要(英文)：Ventilator-associated pneumonia (VAP) is said that the mortality rate is from 24 to 76% and the prevention by oral care is expected, since many of the flame fungus is derived from oral bacteria. By measuring the turbidity of the oral cleaning solution in the mouth by the turbidity meter, it was investigated whether the risk of a potential infection of the oral can be easily inspected and evaluated. Although the number of cases was as small as 12 cases, one case of developing VAP is the worst oral hygiene condition and the highest turbidity of the oral cleaning solution in 12 cases. In the case, the corynebacterium striatum detected from the oral cleaning solution in the first day of hospitalization and intubation in the microflora analysis by 16s rRNA gene sequence was consistent with the bacteria detected in the hospitalization 28 day of blood culture test. It is necessary to active intervention of oral care to the patient under the ventilator management for prevent VAP.

研究分野：疫学・予防医学

キーワード：濁度計 口腔ケア 人工呼吸器関連肺炎

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸器関連肺炎 (ventilator-associated pneumonia : VAP) は、特に長期人工呼吸管理中に発症しやすく、発症すると細菌性肺炎の臨床像を呈し、敗血症から多臓器不全を生じることもあり、死亡率 24~76%といわれている。周術期医療の分野では、VAP の起炎菌の多くが口腔内細菌由来であり、高頻度に分離される菌として、*Oral streptococci* および *Peptostreptococcus*、*Prevotrrlla*、*Fusobacterium* などの嫌気性菌が知られている。したがって、VAP 予防において口腔ケアが重要である可能性が高いが、救命救急センターや集中治療室での日常の口腔ケアは看護師により行われているため、誰もが口腔内を複雑な観察技術で客観的に評価することは困難である。

平成 24 年度より診療報酬に周術期口腔機能管理が新設され、その目的の一つには、医科と歯科が連携して、口腔機能管理を実施することにより誤嚥性肺炎・感染症を予防し治療の向上を目指すものが挙げられる。また、平成 26 年度からは、医科医療機関にも加算が新設され、医科医療機関と歯科医療機関の連携を重要として、ますます連携を推進する動きとなっているなかで、職種を問わず容易に口腔内環境汚染の程度を診断できる簡便なスクリーニング方法がないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では高感度濁度計による口腔内洗浄液の濁りの程度(濁度)に着目し、その数値と口腔内細菌検査との関連、人工呼吸管理患者の日常の口腔ケアを行う際の口腔内洗浄液の濁り(濁度)を濁度計で測定することにより、口腔からの潜在的な感染症のリスクを簡易的に検査および評価できるシステムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

研究期間は 2016 年 6 月~2017 年 5 月まで当院救命救急センター、ICU,当科へ入室した症例のうち経口気管挿管の人工呼吸管理をしている患者で、本人もしくは代諾者により文書で同意を得られた 12 名を対象とした。本研究は宮崎大学医学部 医の倫理 審査委員会の承認のもと実施した(第 2015-074 (0)号)。

挿管後 1 日目に口腔内診察と口腔ケアを行う際に 濁度、細菌検査(スワブによる細菌培養・同定検査と次世代シーケンサーによる細菌解析)、口腔衛生状態(表 1. Revised oral assessment guide : (ROAG)) を評価した。診察および口腔ケアを行う際は、必ず 2 人体制(歯科医師と歯科衛生士)で行い、担当科

医師および看護師の協力のもと患者の体位はセミファーラー位や側臥位で(口腔内、カフ上部、気管内)吸引後に行った。VAP 発症の有無は医学的根拠に基づき担当科医師の診断により判定した。

カテゴリー	方法	スコア1	スコア2	スコア3
口唇	観察	平滑でピンク	乾燥or亀裂、and/or 口角炎	潰瘍or出血
粘膜	観察 ライトと歯科用ミラーを使う(義歯をはずして)	ピンクで、潤いあり	乾燥and/or赤、紫や白色への変化	著しい発赤or厚い白苔 出血の有無にかかわらず水疱や潰瘍
舌	同上	ピンクで、潤いがあり乳頭がある	乾燥、乳頭の消失or赤や白色への変化	非常に厚い白苔 水疱や潰瘍
歯肉	同上	ピンクで引き締まっている	浮腫性and/or発赤	手で圧迫しても容易に出血
歯・義歯	同上	きれいで、食物残渣なし	1)部分的に歯垢や食物残渣 2)う歯や義歯の損傷	全体的に歯垢や食物残渣
唾液	歯科用ミラーを頬粘膜にあてて滑らせる	ミラーと頬粘膜との間に抵抗なし	抵抗が少し増すが、ミラーが粘膜にくっつきそうにはならない	抵抗が明らかに増し、ミラーが粘膜にくっつき、あついはくつきそうになる

表 1. ROAG

細菌検査用滅菌スワブを用いて、口腔粘膜、舌、歯垢から細菌を採取し、細菌の塗抹、培養、同定検査を行った(図 1.)。洗浄用注射器にて蒸留水 20ml で 10 秒間吸引しながら口腔内を軽く洗浄した(図 2.)。吸引した排液 20ml をよく攪拌しうち 10ml をディスプレイ・セルに採取し濁度計(TR-55KRK、笠原理化学工業)(図 3.)にて濁度を測定した(図 4.)。残り 10ml の洗浄液は次世代シーケンサーによる細菌叢の解析に使用した。



4. 研究成果

- 1) 対象の臨床背景  
性別は男性 7 名、女性 5 名(合計 12 名)で年齢は 49~81 歳(平均年齢 66.2 歳 ± 10.7)、気管挿管日数は 1~29 日(平均日数 10.7 日 ± 9.9)だった。研究期間において 12 例中死亡した症例は 2 例あり、そのうち 1 例は VAP 発症した症例で、入院後 48 日目に死去された。
- 2) 口腔内評価(ROAG)濁度計測定値、VAP

発症の有無（表 2.）

ROAG は 6~15（平均 8.4±3.0）濁度計測定値は 242 ~ 876 度（平均 486.3±174.7）VAP 発症症例は 12 例中 1 例（No.7）に認めた。

No.	ROAG	口唇	粘膜	舌	歯肉	菌・真菌	唾液	濁度計測定値	VAPの有無	挿管日数
1	7	1	1	1	1	1	2	616	なし	2
2	9	1	1	1	2	2	2	684	なし	8
3	6	1	1	1	1	1	1	493	なし	11
4	6	1	1	1	1	1	1	321	なし	29
5	6	1	1	1	1	1	1	484	なし	14
6	6	1	1	1	1	1	1	420	なし	6
7	15	2	3	3	2	1	3	876	あり	29
8	6	1	1	1	1	1	1	315	なし	12
9	12	2	2	2	2	2	2	484	なし	14
10	7	1	1	1	1	1	2	498	なし	1
11	10	2	2	2	1	1	2	403	なし	1
12	11	2	2	2	1	1	3	242	なし	1

表 2.

### 3) スワブによる細菌培養検査結果（表 3.）

No.	スワブ細菌培養結果
1	01 常在菌 多数, 02 <i>Candida albicans</i> 極少数
2	01 常在菌 極少数, 02 真菌
3	01 真菌陰性
4	01 <i>Candida albicans</i> 極少数, 02 一般細菌陰性
5	01 <i>Klebsiella oxytoca</i> 少数, 02 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 極少数, 03 常在菌 やや多数, 04 真菌陰性
6	01 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 少数, 02 常在菌 多数, 03 <i>Candida species</i> 極少数
7	01 <i>Candida albicans</i> 極少数, 02 常在菌 多数
8	01 常在菌 少数
9	01 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 少数, 02 常在菌 少数, 03 <i>Candida dubliniensis</i> 極少数 *敗血症性ショックの原因は、クレブシエラ肝膿瘍によるものと診断
10	01 常在菌 多数, 02 真菌陰性
11	01 <i>Candida albicans</i> 極少数, 02 常在菌 少数
12	01 常在菌 やや多数, 02 <i>Candida albicans</i> 少数

表 3.

常在菌以外の同定された細菌は *Candida albicans* 7 例、*Klebsiella oxytoca* 1 例、*Klebsiella pneumoniae* 2 例、*Staphylococcus aureus*(MRSA) 1 例だった。常在菌は主に *Actinomyces*、*Porphyromonas*、*Prevotella*、*Propionibacterium*、*Streptococcus*、*Spirochaetaceae* などであった。

### 4) 16S rRNA 遺伝子シーケンスによる口腔細菌叢の解析

12 個の口腔内洗浄液サンプルから作製されたシーケンスライブラリーの各々から得

られた細菌メタゲノム DNA 配列のシーケンスデータを示す（表 4.）。この得られたシーケンスリードを属・種（Genus species）の生物分類レベルでのデータベース検索および菌叢解析に使用した結果を示す（表 5.）。細菌種は 366 種認められたが、シーケンシングにて多かった細菌種上位 12 位までを表 6. に示す。

各サンプルにおける総リード数 = 100% としてサンプル間での細菌種の比較が行いやすくするためにリード数をそれぞれのサンプル数における割合（%）で示し、各セルの数値の大小に応じて赤色に濃淡を加えた（表 7.）。

Sample (barcode #)	Bases	> Q20	Reads (raw)	Reads (after QC)	Read Length (mean)
• No.01 (#20)	44,004,784	40,714,140	198,963	132,702	221 bp
• No.02 (#25)	40,620,760	37,608,490	185,706	125,847	219 bp
• No.03 (#26)	43,545,332	40,321,946	199,326	131,091	218 bp
• No.04 (#27)	36,910,298	34,280,605	168,484	123,832	219 bp
• No.05 (#28)	49,295,457	45,998,937	220,201	153,397	224 bp
• No.06 (#29)	40,662,127	37,520,144	183,273	123,603	222 bp
• No.07 (#30)	40,147,848	36,979,204	178,296	118,240	225 bp
• No.08 (#31)	46,495,269	43,342,920	201,044	146,019	231 bp
• No.09 (#32)	40,048,501	36,830,263	184,930	119,539	217 bp
• No.10 (#34)	44,001,049	41,120,899	194,247	139,736	227 bp
• No.11 (#47)	34,923,670	32,374,367	155,127	107,899	225 bp
• No.12 (#48)	46,469,452	43,150,703	207,150	150,032	224 bp

表 4. 細菌メタゲノムシーケンスデータ

Genus species	Sample-01	Sample-02	Sample-03	Sample-04	Sample-05	Sample-06	Sample-07	Sample-08	Sample-09	Sample-10	Sample-11	Sample-12	total reads by species	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	12214	3054	5252	0	3891	7069	0	0	789	5633	12661	394	50957	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1343	2028	483	63	0	11745	0	0	39	8409	442	0	24552	
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	152	0	3641	1958	0	0	0	0	18661	24412
<i>Neisseria flavescens</i>	910	155	87	0	6538	3880	0	0	370	8895	232	0	21067	
<i>Mannheimia varigena</i>	2815	2759	1260	124	27	3349	0	0	45	8457	140	13	18989	
<i>Prevotella oris</i>	49	427	113	25	2647	1148	0	0	361	0	634	11891	17295	
<i>Mycoplasma salivarium</i>	17	14	0	0	2101	1395	6120	3591	0	0	342	733	14313	
<i>Prevotella nanceiensis</i>	0	549	0	0	11839	0	0	0	0	832	0	0	13220	
⋮														
<i>Corynebacterium variabile</i>	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
<i>Kingella kingae</i>	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	10	
total reads by sample	47484	37842	51407	27676	53818	39281	32334	28215	32416	53109	36087	70778		

表 5. リード数をサンプルおよび細菌種ごとに表にしたもの（表の一部を抜粋）。

1. *Prevotella melaninogenica*
2. *Haemophilus parainfluenzae*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Neisseria flavescens*
5. *Mannheimia varigena*
6. *Prevotella oris*
7. *Mycoplasma salivarium*
8. *Prevotella nanceiensis*
9. *Rothia mucilaginosa*
10. *Prevotella histicola*
11. *Corynebacterium striatum*
12. *Parvimonas micra*

表 6. シーケンシングにて多かった細菌種（最も多かった順に記載）

Genus species	Sample												total % by species
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	
Prevotella melaninogenica	25.722	5.070%	10.217	0.000%	7.230%	17.996	0.000%	0.000%	2.434%	10.606	35.085	0.557%	117.917
Haemophilus parainfluenzae	2.828%	5.359%	0.940%	0.228%	0.000%	29.900	0.000%	0.000%	0.120%	15.833	1.225%	0.000%	56.433
Enterococcus faecalis	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.282%	0.000%	11.261	6.940%	0.000%	0.000%	0.000%	26.366	44.848
Neisseria flavescens	1.916%	0.410%	0.169%	0.000%	12.148	9.878%	0.000%	0.000%	1.141%	16.749	0.643%	0.000%	43.054
Mycoplasma salivarium	0.036%	0.037%	0.000%	0.000%	3.904%	3.551%	18.927	12.727	0.000%	0.000%	0.948%	1.036%	41.166
Mannheimia varigena	5.928%	7.291%	2.451%	0.448%	0.050%	8.526%	0.000%	0.000%	0.139%	15.924	0.388%	0.018%	41.163
Corynebacterium striatum	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	2.206%	0.000%	31.419	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	33.625
Kingella kingae	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.019%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.019%	0.019%
Schwartzia sp.	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.014%	0.014%
total % by sample	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%

(表の一部を抜粋)

表 7. リード数をそれぞれのサンプル数における割合 (%) で示し、各セルの数値の大小に応じて赤色に濃淡を加えた。

次に細菌叢のうち上位 200 種をサンプル間でクラスター解析し細菌叢の近似を示すためデンドログラムを表示した (図 5.)

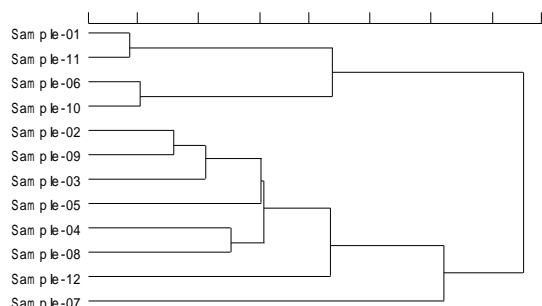


図 5. Cluster analysis

Ward 法によるクラスター解析結果 (デンドログラムは平方距離に基づいて作成)

このクラスター解析結果 (図 5.) を反映させ、サンプル No.01 ~ 12 のデータ配列 (列) をデンドログラムと同様に並び順にした (表 8.)

Genus species	Sample												total % by species
	01	11	06	10	02	09	03	05	04	08	12	07	
Prevotella melaninogenica	25.722	35.085	17.996	10.606	8.070%	2.434%	7.230%	0.000%	0.000%	0.557%	0.000%	117.917	
Haemophilus parainfluenzae	2.828%	5.359%	0.940%	0.228%	0.000%	29.900	15.833	5.359%	0.120%	0.940%	0.000%	56.433	
Enterococcus faecalis	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.282%	0.000%	6.940%	0.000%	26.366	44.848	
Neisseria flavescens	1.916%	0.410%	0.169%	0.000%	12.148	9.878%	0.000%	0.000%	1.141%	16.749	0.643%	43.054	
Mycoplasma salivarium	0.036%	0.037%	0.000%	0.000%	3.904%	3.551%	18.927	12.727	0.000%	0.948%	1.036%	41.166	
Mannheimia varigena	5.928%	7.291%	2.451%	0.448%	0.050%	8.526%	0.000%	0.000%	0.139%	15.924	0.388%	41.163	
Corynebacterium striatum	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	2.206%	0.000%	31.419	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	33.625	
Rothia mucilaginosa	3.009%	4.024%	0.000%	0.094%	0.761%	11.149	11.096	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	30.133	
Prevotella oris	0.103%	1.757%	2.923%	0.000%	1.128%	1.114%	0.220%	4.918%	0.090%	0.000%	16.800	29.054	
Parvimonas micra	0.567%	3.397%	0.066%	1.529%	7.463%	7.866%	0.019%	0.307%	0.217%	2.828%	3.224%	27.483	
Kingella kingae	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.019%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.019%	
Schwartzia sp.	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.014%	0.014%	
total % by sample	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	100.000%	

(表の一部を抜粋)

表 8.

それぞれの細菌属・種の最高値を (Max) に示し、その値が 4.0% 未満の細菌属・種をサンプルごとにしてすべて Others として集計した (表 9.)

Genus species	Sample												Max
	01	11	06	10	02	09	03	05	04	08	12	07	
Prevotella melaninogenica	25.722	35.085	17.996	10.606	8.070%	2.434%	7.230%	0.000%	0.000%	0.557%	0.000%	117.917	
Corynebacterium striatum	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	2.206%	0.000%	0.000%	31.419	
Haemophilus parainfluenzae	2.828%	5.359%	0.940%	0.228%	0.000%	29.900	15.833	5.359%	0.120%	0.940%	0.000%	29.900	
Enterococcus faecalis	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.282%	0.000%	6.940%	0.000%	26.366	26.366	
Prevotella nancentis	0.000%	0.000%	0.000%	1.567%	1.451%	0.000%	0.000%	21.998	0.000%	0.000%	0.000%	21.998	
Prevotella histicola	0.048%	0.213%	0.249%	0.019%	0.182%	0.833%	21.493	0.000%	0.119%	0.000%	0.000%	21.493	
Propionibacterium acnes	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.438%	0.000%	0.000%	19.739	0.305%	0.000%	19.739	
Mycoplasma salivarium	0.036%	0.037%	0.000%	0.000%	0.037%	0.000%	0.000%	3.904%	0.000%	12.727	1.036%	18.927	
Corynebacterium simulans	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.424%	0.043%	0.000%	18.569	
Actinomyces radicans	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	17.661	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	17.661	
Actinomyces graevenitzi	0.000%	4.087%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	4.087	
Veillonella alcalescens	0.331%	1.967%	4.015%	4.075%	1.992%	0.296%	0.607%	0.647%	0.441%	0.082%	1.848%	10.800	
Others	23.848	31.610	14.689	14.293	40.489	25.466	19.785	25.807	51.666	23.388	26.073	100.000	

(表の一部を抜粋)

表 9.

最後に「属、種 (Genus species)」レベルでの 100% 積み上げ型横棒グラフを示す (図 6.)



図 6.

最も上段の横棒グラフが VAP を発症した Case No.7 の症例 (Sample-07) を示し、濃いオレンジ色の横棒は Corynebacterium striatum であり、他の 11 症例と比較し極端にこの菌種が占める割合が多くなっている。

VAP を発症した Case No.7 は研究対象の症例数が 12 例と少ないものの口腔内評価にて ROAG が最も高値であり、口腔内洗浄液が最も濁度が高い (濁りの強い) 症例であった。また、この症例において入院・挿管後 1 日目に口腔内洗浄液より検出された Corynebacterium striatum が、入院 28 日後の血液培養検査にて検出された。

これまでの報告には洗口吐出液中の濁度を指標とした口腔清潔度検査について関連性を示した報告があるが、経口挿管患者における口腔洗浄液の濁度と口腔衛生状態との関連や VAP 発症との関連を調査した研究はなかった。今回の研究では症例数が少なく口腔内洗浄液の濁度と口腔内汚染環境との相関関係について評価するには不十分であったため今後も症例数を

増やし評価していく必要があると考えられた。また、口腔内細菌が全身に関わる影響を再確認し、院内や地域での誤嚥性肺炎患の予防につながるような活動を行っていくことが必要と考える。当科では7名の歯科衛生士による周術期口腔機能管理（口腔ケア）を日々行っているが、VAP 予防の新たな戦略として、包括的な呼吸管理のために多種職が連携することが求められており、今後、人工呼吸器管理患者への積極的な口腔ケアの介入を進めていく必要があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 井川加織、馬場園恵、野海健太、福井文仁、有村慶一、田村知文、温水佳世子、金氏毅、末廣雄作、近藤雄大、永田順子、山下善弘、人工呼吸器管理患者における口腔内細菌叢の検討. 2018年2月10日(土) 第37回宮崎感染症研究会 ホテルスカイタワー

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井川 加織 (IGAWA, Kaori)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90423722

##### (2) 研究分担者

山下 善弘 (YAMASHITA, Yoshihiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：30254634

##### (3) 研究分担者

永田 順子 (NAGATA, Junko)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：50264429