

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592348  
 研究課題名（和文） 新規呼吸器感染症菌検出法の要介護高齢者への応用およびその口腔状況からの検討  
 研究課題名（英文） Application of New Generation Respiratory Pathogens Detection System to Elderly in Aspiration Pneumonia Prevention  
 研究代表者  
 関 みつ子（SEKI MITSUKO）  
 日本大学・歯学部・助教  
 研究者番号：20226640

研究成果の概要（和文）：新規検出法である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いて呼吸器感染症菌（肺炎球菌、インフルエンザ菌および髄膜炎菌）の検出方法を開発し、過去の疫学調査から得られた臨床データおよび脳脊髄液サンプルを用いてその臨床的有用性を明らかにした。さらに、要介護高齢者のインプラントを含む口腔状況について調査を行い、口腔ケアにおける問題点を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed the Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay detecting respiratory pathogens (pneumococcus, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*). The LAMP assays were evaluated using cerebrospinal fluid (CSF) specimens collected at the past surveillance studies. The results suggest that the LAMP methods are sensitive and accurate means of diagnosing infection in CSF. Moreover, we investigated about oral conditions including dental implant status on elderly of nursing care home and clarified issues of their oral care.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：感染症，細菌，検出方法，国際研究者交流，韓国：米国，老年歯科

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌、インフルエンザ菌莢膜型 b (Hib) および髄膜炎菌は髄膜炎、肺炎、中耳炎の 3 大原因菌で、我が国では特に老人や小児において問題であり、その QOL や生命にも係わる。したがって、簡便で正確な検出法の確立は早期診断と的確な治療、良好な予後に繋がるにもかかわらず、従来法には問題があり、

これらの菌の正確な同定は困難であった。また、超高齢化社会や女性の社会進出は老人や小児の集団生活を余儀なくさせ、同時に呼吸器感染症流行の危険性をも増大させている。髄膜炎は小児死亡原因世界第 1 位で、肺炎球菌、Hib のワクチン接種は多くの国で行われているが、我が国ではこれらのワクチン接種が始まったばかりである。新型インフルエン

ザの流行は肺炎感染症リスクを増大させ、肺炎球菌ワクチン接種需要の増大を招いている。呼吸器感染症菌モニタリング法は集団における感染をコントロールする上で有効なツールであるのみでなく、誤嚥性肺炎リスクの高い高齢者においても、その精確なデータは不可欠で、簡便な検出方法が求められている。従来の検出法は培養法と生化学的検査を併用したものであり判定までに3日以上を要する。また分子生物学的方法としてPCR法もあるが、複雑な手技とコストおよび迅速性に問題があり、一般に普及していない。さらに、近年、従来法（培養法およびPCR法）では検出同定の精確性に問題があるとの報告が数多く認められ、両菌の精確で簡便な検出同定は事実上困難である。

一方、インプラント治療は良好な口腔清掃状態を有する患者への応用が求められ、しかも口腔への維持安定が必須である。しかし、その患者が高齢となり脳梗塞や痴呆等の介護を要する状況になった場合、良好な口腔清掃状態維持は困難である。しかも心臓病等の全身疾患により、観血処置も困難になった場合には口腔からの撤去も不可能等、様々な問題を生じることが今後予測される。近年、高齢者介護の現場から口腔内に埋入されたインプラント体をどのように扱ったらよいのかという声が数多く聞かれ（Verbal communication）、我々歯科医療人は“口腔への維持安定”のみの短期的な視点から、人生の長期的な視点に立脚したインプラント体の新たな設計方法を考える時期に来ている。

## 2. 研究の目的

我々は肺炎球菌、Hib および髄膜炎菌の精確・簡便な検出法を開発する。要介護高齢者集団において高齢者の歯やインプラント体が口腔細菌に与える影響について検討する。さらに、老人ホームスタッフが口腔ケアを行った場合の菌層の変化について、それぞれの口腔の特徴（無歯顎者、有歯顎者およびインプラントを有する者）から検討する。

## 3. 研究の方法

はじめに、肺炎球菌、Hib および髄膜炎菌のLAMP法による検出法を確立し、確立された検出法の応用を試みた。試料として過去の疫学調査（韓国ソウルの国際ワクチン研究所におけるプロジェクト）から得られた臨床データおよび脳脊髄液サンプルを用いてその臨床的有用性を明らかにした。同一のサンプルで従来法の培養による検出法やPCR法のデータと新しく開発された検出法を比較し、評価した。本研究は、韓国のハンヤン大学及び米国のウェイン州立大学との共同研究である。髄膜炎菌検出法の検討に必要な臨床株に

ついては国立感染症研究所の研究者（細菌第一部・大西部長、高橋主任研究官）の協力を仰いだ。

次に、要介護高齢者のインプラントを含む口腔状況について調査を行い、口腔ケアにおける問題点を明らかにした。本研究は、日本大学歯学部、竜爪園及び静岡県工業技術研究所食品環境科えん下改善プロジェクトスタッフとの間の共同研究契約（締結済み）に基づいて実施した。老人ホームスタッフが口腔ケアを行った場合の菌層の変化についてもそれぞれの口腔の特徴および身体機能等から検討を行い、また、インプラント治療が施されている介護老人福祉施設入居者への対応および口腔ケアの問題点についてもアンケートを交えて検討した。

## 4. 研究成果

（1）肺炎球菌検出方法の開発および臨床応用：肺炎球菌検出用LAMP法のプライマーの開発および臨床応用について検討を行った。その結果、開発された方法は肺炎球菌感染症の臨床診断ツールとして有用であることが明らかとなり、論文発表（Plos One, 2012）を行った。また、国際学会（米国感染症学会）、国内研究会（LAMP研究会）および国際シンポジウム（肺炎球菌シンポジウム）においても発表した。肺炎球菌シンポジウムではエリートポスターに採択され、口頭発表も行った。さらに、本検出方法の発展型として新たに検査システム及び検査方法を考案し、特許出願した。

（2）Hib 検出方法の開発および臨床応用：Hib 検出用LAMP法のプライマーの開発および臨床応用について検討を行った。その結果、開発された方法はHib 感染症の臨床診断ツールとして有用であることが明らかとなり、論文発表（J Clin Microbiol, 2011）を行った。さらに、国際学会（IUMS）および国内の研究会（LAMP研究会）においても発表を行った。

（3）髄膜炎菌検出方法の開発および臨床応用：髄膜炎菌検出用LAMP法のプライマーの開発および臨床応用について検討を行った。その結果、開発された方法は髄膜炎菌感染症の臨床診断ツールとして有用であることが明らかとなり、同検出方法については米国特許出願1件（国際共同出願；韓国のハンヤン大学、米国ミンガンのウェイン州立大学および日本大学）を行った。本研究成果については国内の研究会（LAMP研究会）において発表し、2013年7月の欧州微生物学会においても発表を予定している。

以上、（1）～（3）の成果は国際的にも高い評価を得、2013年2月には、韓国ハンヤン

大学の研究協力者 Dr Kim および大学院生 2 名を招聘、研究ミーティングおよびセミナーを行い、第 5 回 LAMP 研究会にて成果発表した。さらに、2013 年 4 月、韓国の成均館大学で開催された国際シンポジウムにおいて講演を行い、また同年 5 月には韓国微生物学会の国際大会においても講演を行った。

(4) 要介護高齢者における嚥下機能の低下と口腔衛生状態との関連性：高齢者（現在歯を有する要介護高齢者）の口腔内細菌の状況と嚥下機能との関連性を検討した結果“現在歯を有する高齢者の口腔ケアのプランニングでは、高齢者の嚥下機能を把握し、機能低下が認められる場合、誤嚥性肺炎予防のために専門的口腔ケアが必要であるとの結論を得た。以上については、口腔衛生学会にて発表し、論文発表（口衛会誌）も行った。

(5) 介護老人福祉施設における口腔ケアの実態—インプラント治療が施されている入居者への対応および口腔ケアの問題点：介護老人福祉施設にてアンケートを行い、問題点について解析した。その結果“高齢者介護の現場ではインプラントの口腔ケア等に関する知識の不足、入所前の歯科情報が少なくインプラントの有無が不明などの問題があり、今後は介護施設入所前の高齢者の歯科情報の把握、歯科医療従事者から介護者への口腔ケアに関する教育等が必要”との結論を得、論文発表（老年歯誌）を行った。実際、要介護高齢者のインプラントを将来どのようにケアしていくのか？という問題については過去において取り扱われた報告は無く、多くの反響があった。日本歯科医学会総会および口腔衛生学会においてポスター発表し、また現在、国際誌への投稿も予定している。

(6) 高齢者の口腔ケアと口腔内細菌状況の関連性について：ランダム化比較試験によって、短期の専門的口腔ケア（週 1 回、1 か月間の歯科衛生士による口腔ケア）は要介護高齢者の口腔衛生環境改善に寄与することを明らかにした。高齢者の口腔ケアについては従来、長期間にわたる専門的口腔ケアについてその効果が指摘されてきたが、比較的短期間の専門的口腔ケアでも要介護高齢者の口腔衛生環境改善に寄与することを明らかにした本研究は、超高齢化社会の我が国や先進諸国の高齢者保健計画において大いに寄与するものと考えられる。同成果については、口腔衛生学会および国際歯科研究学会日本部会（JADR）にてポスター発表し、現在、国際誌に論文投稿中である。

## 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 4 件）

①. Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, Kim SA, Anh DD, Dong BQ, Kim JS, Seki M. The enhanced pneumococcal LAMP assay: A clinical tool for the diagnosis of meningitis due to *Streptococcus pneumoniae*. Plos One 2012, 7(8):e42954 (査読有), doi, 10.1371/journal.pone.0042954.

②. 萩原芳幸, 森野智子, 関みつ子, 澤田久仁彦. 介護老人福祉施設における口腔ケアの実態—インプラント治療が施されている入居者への対応および口腔ケアの問題点の抽出— 老年歯科医学 2012, 27, 104-13 (査読有) URL,

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsg/27/2/27\\_104/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsg/27/2/27_104/_article/-char/ja/)

③. 森野智子, 大川勝正, 萩原芳幸, 関みつ子. 現在歯を有する要介護高齢者における嚥下機能の低下と口腔衛生状態との関連性. 口腔衛生学会雑誌 2012, 62, 478-83 (査読有) URL,

<http://www.kokuhoken.or.jp/jsdh/journal/62-5.html>

④. Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, Kim SA, Anh DD, Seki M. Loop-Mediated Isothermal Amplification assay to detect *Haemophilus influenzae* type b in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol, 2011, 49, 3621-6 (査読有) doi: 10.1128/JCM.00515-11

〔学会発表〕（計 15 件）

①. Seki M, Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays for the Diagnosis of Bacterial Meningitis in Developing Countries, 2013 International Meeting of the Microbiological Society of Korea (招待講演), 2013 年 05 月 02 日, Chonbuk National University (Jeonju, Korea)

②. Seki M, New Generation Molecular Diagnostics —Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)—, The 5th Microbial Pathogenesis & Immunity Symposium (招待講演), 2013 年 04 月 30 日, Sungkyunkwan University (Suwon, Korea)

③. 関みつ子, LAMP 法による髄膜炎菌検出方法の開発, 第 5 回 LAMP 研究会, 2013 年 02 月 23 日, 富士通ソリューションスクエア(東京都)

④. 萩原芳幸, インプラント治療が施されている要介護患者の口腔ケアの実態, 第 22 回 日本歯科医学会総会, 2012 年 11 月 09~11 日, 大阪国際会議場(大阪府)

⑤. 森野智子, 介護老人福祉施設入居者におけるインプラント加療の実態と口腔ケア

における問題点, 第 61 回 日本口腔衛生学会・総会, 2012 年 05 月 26 日, 神奈川歯科大学 (神奈川県)

⑥. Seki M, Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Haemophilus influenzae* b and *Streptococcus pneumoniae*, The 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, 2012 年 03 月 12 日, Rafain Palace Hotel (Iguassu Falls, Brazil)

⑦. 関みつ子, LAMP 法による臨床サンプルからの *Haemophilus influenzae* type b 検出, 第 4 回 LAMP 研究会, 2012 年 03 月 03 日, 富士通ソリューションスクエア (東京都)

⑧. Seki M, Loop-mediated isothermal amplification for detecting *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid. The Annual Meeting of 49th Infectious Disease Society of America, 2011 年 10 月 22 日, Boston Convention and Exhibition Center (Boston, MA, USA)

⑨. 森野智子, 要介護高齢者の嚥下機能低下が口腔衛生状況に及ぼす影響, 第 60 回日本口腔衛生学会・総会, 2011 年 10 月 09 日, 日本大学松戸歯学部 (千葉県)

⑩. Seki M, Loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Haemophilus influenzae* type b in cerebrospinal fluid. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, 2011 年 09 月 10 日, Sapporo Convention Center (北海道)

⑪. Kilgore PE, Application of Molecular Methods for the Diagnosis of Pneumococcal Meningitis in Children. The 6th Ewha Vaccine Symposium (招待講演), 2011 年 04 月 15 日, Ewha Womans University (Seoul, Korea)

⑫. 関みつ子, LAMP 法による臨床サンプルからの肺炎球菌検出, 第 3 回 LAMP 研究会, 2011 年 03 月 05 日, 汐留シティセンター (東京都)

⑬. Morino T, Effect of Professional Oral Health Care on Elderly: Randomized Trial, Japanese association for Dental Research, 2010 年 11 月 20 日, 九州歯科大学 (福岡県)

⑭. 大川勝正, 短期の専門的口腔ケアが軟口蓋部細菌叢に及ぼす影響ーランダム化比較試験一, 第 59 回 日本口腔衛生学会・総会, 2010 年 10 月 07 日, 朱鷺メッセ(新潟県)

⑮. 関みつ子, 短期の専門的口腔ケアは口腔衛生環境改善に寄与するーランダム化比較試験一, 第 59 回 日本口腔衛生学会・総会, 2010 年 10 月 07 日, 朱鷺メッセ(新潟県)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 検査システム及び検査方法

発明者: 関みつ子他 2 名

権利者: 日本大学他

種類: 特許

番号: 特願 2012-226761

出願年月日: 2012 年 10 月 12 日

国内外の別: 国内

名称: Meningococcal Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay

発明者: Seki M, Kim DW, Kilgore PE

権利者: 日本大学、ハンヤン大学、ウェイン州立大学

種類: 特許

番号: 61727437

出願年月日: 2012 年 11 月 16 日

国内外の別: 外国

[その他]

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/54/0005322/profile.html#menkyo>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関みつ子 (SEKI MITSUKO)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 20226640

(2) 連携研究者

萩原 芳幸 (HAGIWARA YOSHIYUKI)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号: 00228389

鈴木 直人 (SUZUKI NAOTO)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号: 10226532

(3) 研究協力者

森野 智子 (MORINO TOMOKO)

静岡大学・短期大学部・講師

研究者番号: 20582703

大西 真 (OHNISHI MAKOTO)

国立感染症研究所・細菌第一部・部長

研究者番号: 10233214

高橋 英之 (TAKAHASHI HIDEYUKI)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号: 60321866

大川 勝正 (OOKAWA KATSUMASA)

静岡県工業技術研究所・主任研究員

Paul Evan Kilgore

ウェイン州立大学・薬学部・准教授

Dong Wook Kim  
ハンヤン大学・薬学部・准教授

Soon Ae Kim  
国際ワクチン研究所・トランスレーショナル  
リサーチ部門・研究員