

高齢者の口腔常在微生物叢と
口臭に関する研究

A. 宛名：分担研究者 齊藤 毅 殿

B. 指定課題名：平成 12 年度医療技術評価総合研究事業

「高齢者の口腔保健と全身的な健康状態の関係についての総合研究」

C. 研究協力課題名：「高齢者の口腔常在微生物叢と口臭に関する研究」

D. 研究協力者：前田伸子・鶴見大学、歯学部教授、石川正夫・ライオン研究所

E. 研究目的：

高齢者では免疫力が低下することにより口腔内細菌叢に変化が生じ、日和見感染のリスクが高くなる可能性が示唆されている。一方で、介護を必要とする高齢者の口臭が施設などで問題となっている。そこで、我々は高齢者の口腔細菌叢と口臭に関与する因子を経年的に調査することが重要であると考え、厚生科学研究で行ったフィールドの中で新潟地区在住の 70 歳者 43 名を対象に口腔状態と口腔細菌叢の関連性を 3 年間にわたり調査した。

F. 研究方法：

新潟県在住の 70 歳者 43 名(男性 15 名, 女性 28 名)による調査を実施した。また、3 年間の経年変化調査は 3 年間の全調査に参加した 25 名(男性 9 名, 女性 16 名)で行った。口腔内診査項目として残存歯数、義歯装着の有無について調査し、唾液量と唾液緩衝能、唾液中の lactobacilli および mutans streptococci 菌数、舌表面の Candida、Staphylococci および fusobacteria 数、舌苔のメチルメルカプタン(以下 CH₃SH)産生量を測定した。口腔診査項目の残存歯数、義歯の有無はじめ唾液の性状、唾液菌数、舌表面菌数は各因子間の相関は重回帰分析により、経年変化は分散分析により評価した。

G. 研究結果・考察：

義歯装着により、Candida と lactobacilli が増加し($p < 0.01$)、mutans streptococci も増加傾向を示した。一方、唾液量の多い被験者では Candida および staphylococci 数が有意に少なかった(各 $p < 0.01$)。このことから、mutans streptococci と lactobacilli、Candida と staphylococci は正の相関があり、これらの微生物は義歯の装着や唾液流量の低下により増加することが確認できた。舌苔からの CH₃SH 産生は fusobacteria 数と正の相関性が示唆され、fusobacteria が CH₃SH 産生に関与する可能性が示唆された。また、Candida は舌苔の CH₃SH 産生能が最も高いレベルを示す被験者では逆に少なく、fusobacteria と Candida は舌表面で拮抗関係にあるように思われた。3 年間の口腔内状態変化として義歯装着者率に変化はなかったが、残存歯数は開始時の 18.00 ± 8.25 本が 1 年後に 17.80 ± 8.22 本、2 年後に 17.60 ± 8.36 本に減少した。唾液からの mutans streptococci、lactobacilli は有意に減少し、舌からの staphylococci も減少したが Candida は 2 年後より 3 年後にかけ増加した。また、CH₃SH 産生量は 3 年間ほとんど変化しなかった。

H. 結論：

1. mutans streptococci と lactobacilli、Candida と staphylococci に正の相関があり、これらの細菌は義歯の装着や唾液流量の低下により増加する。
2. fusobacteria が CH₃SH 産生に関与する可能性が示唆された。
3. fusobacteria と Candida は舌表面で拮抗関係にあることが示された。

I. 研究発表論文：

論文別刷り

70歳者の口腔微生物叢に関する研究

前田伸子、石川正夫、菅田英喜、武藤隆嗣、森戸光彦、安藤雄一、渋谷耕司、宮崎秀夫

緒言

高齢化社会を迎え、高齢者の口腔と全身健康との関連性に関する調査・研究が注目されて来ている。厚生科学研究8020データバンク構築事業でも全国80歳者約2000名の口腔および全身状態の調査が実施され、口腔状態と全身健康との関連性がより明らかになってきた¹⁾。Salzman と Peterson は、70歳を越えると生体の免疫力が低下し口腔内細菌叢に変化を生じ、日和見感染や誤嚥性肺炎が起りやすくなると報告している²⁾。また、児玉は有床義歯装着より義歯付着物を分析し、多数の悪臭成分を検出している。そこで、高齢者の口腔状態と口腔細菌叢を日和見感染はじめ口臭に関与する因子も着目しながら経年的に調査することは、高齢者の健康と QOL 向上の面からも重要と考え、今回、厚生科学研究で行ったフィールドの中で新潟地区在住の70歳者43名を対象に口腔状態と口腔細菌叢の関連性を3年間にわたり調査した。

調査対象および方法

1. 被験者

新潟県在住の70歳者43名(男性15名、女性28名)による調査を実施した。また、3年間の経年変化調査は全調査に参加した25名(男性9名、女性16名)で調査した。被験者の内訳を表1に示す。

表1 被験者内訳

調査年	年齢	男	女	合計
1998	70	15名	28名	43名
1999	71	9名	16名	25名
2000	72	9名	16名	25名

2. 試料採取および検査項目

1) 口腔内診査

口腔内診査項目として残存歯数、義歯装着の有無について武藤等の方法³⁾に従い調査した。

2) 唾液の性状と唾液中細菌の確認

(1) 唾液量と唾液緩衝能の測定

唾液は唾液採取用チューブ(Salivette;Sarstedt, ドイツ)を用い、口腔内で3分間咀嚼させて採取した。採取後の唾液チューブの重量から採取前の唾液チューブの重量を引いたものを3分間の唾液量とした。このチューブを3,000rpm, 10分間遠心分離機にかけ、得られた唾液上清試料10 μ Lを唾液緩衝能評価キット(Dentobuff strip;Orion, フィンランド)に滴下し、キットに添付された判定表を一部改変して緩衝能を評価した。すなわち3分後の変色で、class1;(黄)、class2;(黄緑)、class3;(緑)、class4;(青緑)、class5;(青)、class6;(唾液滴下後、速やかに青に変化したもの)に分け、class6が最も緩衝能が高く、class1が最も低いと評価した。

(2) lactobacilli の菌数

唾液試料 40 μ L を lactobacilli 培養キットの培地(Dentocult LB:Orion)に塗抹した後、37°C、48 時間培養後に発育したコロニー数を測定し、lactobacilli 菌数(CFU/mL)とした。

(3) mutans streptococci の class 分類

唾液試料 20 μ L を本菌培養用キット(Dentocult SM:Orion)付属のストリップに滴下し、培地内に挿入後、37°C、48 時間培養後、判定基準に従って、class0(10⁵CFU/mL 未満：コロニーがほとんど認められない)、class1(10⁵CFU/mL 未満：わずかにコロニーが認められる)、class2(10⁵~10⁶CFU/mL)、class3(10⁶CFU/mL 以上)の4段階に分類し、評価した。

3) 舌表面の細菌の確認

被験者の舌左半分より滅菌綿棒を回転させながら、10 秒間舌面を擦過したものを舌表面の試料とし、Candida 培養用キットの培地(DentocultCA+Orion)に塗抹し 25°C、48 時間培養後、発育したコロニー数を測定し、Candida 菌数 (CFU) とした。Staphylococci は、被験者の右半分より Candida と同様の方法で試料を採取し、ブドウ球菌用選択培地(マンニット食塩培地；栄研化学、東京)に塗抹した後、38°C、48 時間培養後に発育したコロニー数を測定し、菌数とした。Candida に関しては、菌数を Grade1；0CFU(コロニーが全く見られない)、Grade2；1~20CFU、Grade3；21~100CFU、Grade4；101CFU 以上の4段階に分類した。fusobacteria は、舌中央奥の部位より舌苔を滅菌ミクロスパーテルで一掻き採取し、直ちに 0,05%L-メチオニンを含んだ Todd Hewitt Broth 培地(DIFCO, Detroit, アメリカ)2.5mL に懸濁・分散後、同培地で 10~1000 倍まで希釈した液 100 μ L を変法 FM 培地(日水製薬株, 日本)に塗抹し 37°C、5 日間嫌気培養(窒素:水素:二酸化炭素が 8:1:1 の混合ガス)後、コロニー数(CFU)測定した。

4) メチルメルカプタン(以下 CH₃SH) 産生量の評価

口臭の主原因物質である揮発性硫黄化合物の CH₃SH 産生能を石川らの方法⁵⁾に準じて行った。すなわち、舌中央奥の部位より舌苔を滅菌ミクロスパーテルで一掻き採取し、直ちに 0,05%L-メチオニンを含んだ Todd Hewitt Broth 培地 2.5mL に懸濁し、5°C、48 時間冷暗保存した後、37°C、24 時間嫌気培養した。

5) 統計分析

口腔診査項目の残存菌数、義歯の有無はじめ唾液の性状、唾液菌数、舌表面菌数は、各因子間の相関は重回帰分析により、経年変化は分散分析により評価した。

結 果

1. 初診時の調査因子の相関性

初診時における口腔審査、唾液中細菌、舌表面の細菌、舌苔の CH₃SH 産生量の結果における因子間の相関性および回帰分析の結果を表 2 に示す。

表 2 調査因子間の相関係数

因子	CH ₃ SH	性	菌数	義歯	唾液量	緩衝能	Lactba	mutans	Cand	staph
性	-0.246									
菌数	0.071	-0.042								
義歯	0.097	0.170	-0.577**							
唾液量	-0.086	-0.167	0.035	0.023						
緩衝能	-0.088	-0.068	0.320*	-0.142	0.286+					
Lactba	0.091	-0.103	-0.350*	0.496**	0.164	0.127				
mutans	-0.091	-0.113	-0.369*	0.286+	-0.101	0.003	0.479**			
Cand	0.105	0.301*	-0.150	0.217	-0.456**	-0.153	0.260+	0.028		
Staph	-0.111	0.109	-0.050	-0.043	-0.473**	0.108	-0.194	-0.182	0.343*	
Fuso	0.295+	0.053	0.107	-0.211	-0.239	-0.235	-0.291	-0.203	0.166	0.150

性 (男:1, 女:2)

(n=43) +:p<0.1 *:p<0.05 **:p<0.01

菌数 (残存菌数)

義歯 (なし:0, あり:1)

唾液量 (mL/3分間)

緩衝能 (1:黄, 2:黄緑, 3:緑, 4:青緑, 5:青, 6:唾液滴下後速やかに青に変化)

Lactba (lactobacilli; 0:0, 1:1~10, 2:11~100, 3:101~1000, 4:1001~CFU/mL)

mutans (mutans streptococci; 0:0, 1:<10⁵, 3:>10⁶bacteria/mL saliva, 2:between 1 and 3)

Cand (Candida; 1:0, 2:1~20, 3:21~100, 4:101~CFU)

Staph (staphylococci; 0:0, 1:1~10, 2:11~100, 3:101~1000, 4:1001~CFU)

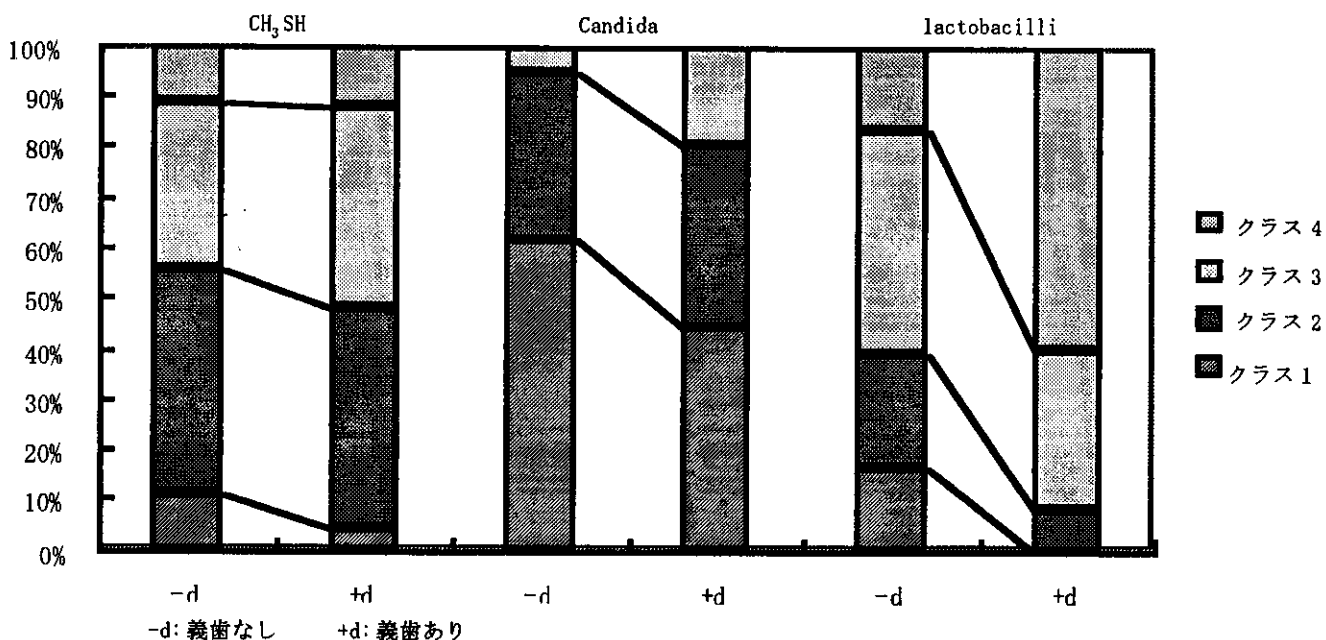
Fuso (fusobacteria; 0:0, 1:1~10, 2:11~100, 3:101~1000, 4:1001~CFU)

初診時の残存菌数は男性 19.13±8.47 本、女性 18.43±8.32 本でほぼ同程度であった。性差の認められた因子として Candida があり、女性が男性に比べ高かった (p<0.05)。また、義歯装着により lactobacilli が増加し (p<0.01)、mutans streptococci も増加傾向を示した。唾液量の多い被験者は唾液より舌表面の細菌、Candida, staphylococci が有意に減少していた (各 p<0.01)。また、舌苔からの CH₃SH 産生は fusobacteria 数と正の相関性が示唆された。

2. 義歯装着の有無による Candida, lactobacilli, CH₃SH 産生量の変化

今回の調査では義歯装着者は男性が 46.7% (15 名中 7 名)、女性が 64.3% (28 名中 18 名) で女性の装着率が高かった。男女含めて、義歯装着の有無による Candida はじめ、lactobacilli, CH₃SH 産生量の影響をクラス別に調べた結果を図 1 に示す。

図1 義歯の有無による CH₃SH 産生、Candida、lactobacilli の変化



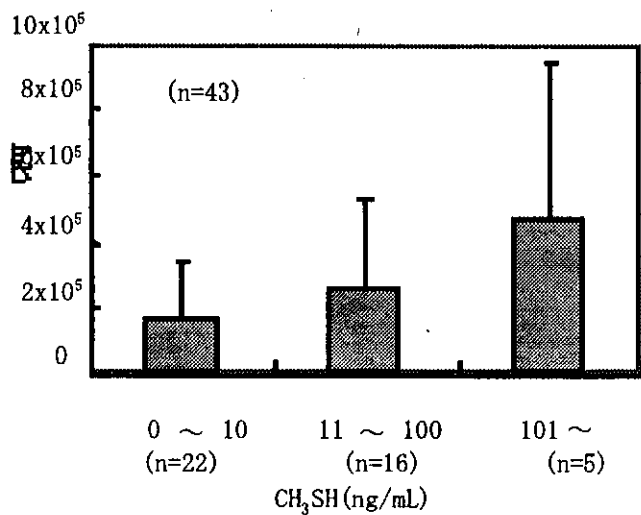
義歯装着により、Candida が増加することが報告されているが⁶⁾、lactobacilli はクラス 1, 2 が減少し、クラス 4 が大きく増加していた。しかし、舌苔からの CH₃SH 産生能は各クラスで義歯の有無による変化は見られなかった。

3. 舌苔の CH₃SH 産生能と舌表面細菌との関係

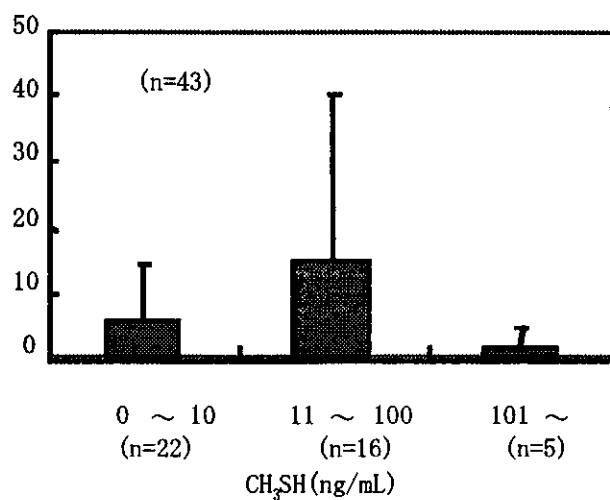
舌苔の CH₃SH 産生能と舌表面細菌の fusobacteria および Candida 菌数との関係について調べた結果を図 2 に示す。

図2 舌苔の CH₃SH 産生量と舌表面細菌との関係

a) fusobacteria との関係



b) Candida との関係



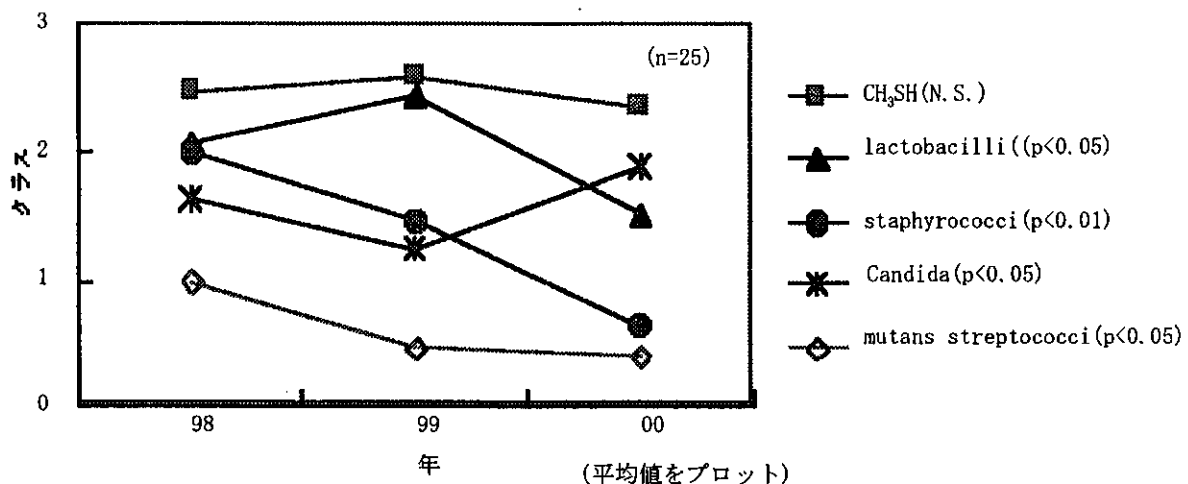
舌苔の CH₃SH 産生能は、舌表面細菌の fusobacteria コロニー数の増加により増えることが示

唆された($p=0.051$)。しかし、Candida は舌苔の CH_3SH 産生能が最も高いレベルでは逆に減少した。このことから、fusobacteria と Candida は舌表面で菌数が増加するに従い、両菌間の生育に牽制が起こることが示唆された。

3. 口腔細菌叢の3年間における推移

43名の調査対象者中で3年間の全調査に参加した25名についての測定結果を図3に示す。

図3 口腔細菌叢の3年間における推移



全調査に参加した被験者は男性9名、女性16名で、調査開始時の男女比(男子が全体の34%)とほぼ同じであった。3年間の口腔内状態変化として義歯装着者率に変化はなかったが、残存歯数は開始時の 18.00 ± 8.25 本が1年後に 17.80 ± 8.22 本、2年後に 17.60 ± 8.36 本に減少した。唾液からのmutans streptococci, lactobacilliは有意に減少し、舌からのstaphyrococciも減少したがCandidaは2年後より3年後にかけ増加した。また、 CH_3SH 産生量は3年間ほとんど変化しなかった。

考 察

本研究では新潟県在住70歳者43名における口腔状態と口腔細菌叢との関連性調査をするとともに、3年間の全調査に参加した25名について細菌叢の経年変化をまとめた。その結果、実験開始時、Candidaに性差が認められたが(表2)、他の細菌では認められなかった。細菌間においてはmutans streptococciとlactobacilliはじめCandidaとstaphylococci間の相関が認められ、これらの細菌は義歯の装着や唾液流量の低下により増加することが確認できた。しかし、舌苔のメチルメルカプタン産生能はこれら因子との関連性はなく、fusobacteriaのみが関連すると思われた。従って、口臭の発生源として注目されている舌苔中のfusobacteriaを測定することにより口臭のリスクが予測できるものと考えられる。3年間の調査でも、舌苔のメチルメ

ルカプタン産生能は大きな変化は認められなかったが, staphylococci, mutans streptococci, lactobacilli は減少し, Candida は増加傾向を示した(図 3)。この期間で, 義歯装着率は変わらなかったが, 残存菌数は 18.0 ± 8.2 本が 17.6 ± 8.4 とやや減少したことから菌数減少に対する残存菌数の影響も考えられる。今後, さらに調査を継続することにより, 口臭の原因成分であるメチルメルカプタン産生能に fusobacteria 以外に, どのような因子がに關与するかを明らかにしたい。

文 献

- 1) 厚生省科学研究「口腔保健と全身的な健康状態の關係」運営協議会：小林修平 編集
8020者のデータバンクの構築について (財) 口腔保健協会, 2000.
- 2) Salzman R. L. and Peterson P. K. : Immunodeficiency of the elderly.
Rev. Infect. Dis. 9 : 1127-1139, 1987.
- 3) 児玉睦雄：義歯付着物中に含まれる臭気物質について. 日大歯学 39 : 433-444, 1965.
- 4) 武藤隆嗣, 菅田英喜, 前田伸子, 松本亀治, 森戸光彦：長期療養者ならびに寝たきり者の
口腔常在微生物叢に関する研究. 口腔衛生会誌 50 : 351-360, 2000.
- 5) 石川正夫, 渋谷耕司, 常田文彦：舌苔のメチルメルカプタン産生能について. 第47回日本
口腔衛生学会関東地方会抄録集, 19, 1998.
- 6) Maeda N. : Distribution of Candida in oral cavities of elderly people.
Abstracts. JADR. 1998.
- 7) Percival R. S., Challacombe S. J. and Marsh P. D. : Age-related microbiological
changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. J. Med.
Microbiol. 35 : 5-11, 1991.
- 8) Marsh P. D., Percival R. S., Challacombe S. J. : The influence of denture-
wearing and age on the oral microflora. J. Dent. Res. 71 : 1374-1381, 1992.

20001059

P.109-132は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

長期療養者ならびに寝たきり者の口腔常在微生物叢に関する研究

武藤隆嗣 菅田英喜 前田伸子 松本亀治 森戸光彦

口腔衛生学会雑誌 50(3) 2000 P.351-360

高齢者の口腔常在微生物叢に関する研究—第1報 施設入居者と自宅生活者の比較—

武藤隆嗣 菅田英喜 前田伸子 松本亀治 森戸光彦

老年歯科医学 14(3) 2000 P.297-306

高齢者の口腔感染症に関する研究

研究協力課題名：高齢者の口腔感染症に関する研究

研究協力者：泉福英信・国立感染症研究所研究所・口腔科学部・主任研究官

目的

口腔は様々な細菌によって感染を受け、歯表面で歯垢のような粘着性の高いバイオフィルムが形成される事により、さらに多くの病原性細菌を蓄積しやすい環境となる。高齢者は、老化や様々な全身疾患を有する事から感染に対する防御力が低下し、口腔感染への感受性は高まっているものと考えられる。そこで特別養護施設内の要介護高齢者の口腔内細菌の検出を試み、細菌の感染の有無と全身疾患の関連について検討を行った。

方法

1. 対象者：65才から105才までの介護の必要な特別養護老人ホーム329名（平均年齢82才）で、男性が67名、女性が262名を対象にした。要介護者のうち、生活自立者が10%、準寝たきり者が30%、寝たきり者（座位可能）が32%、寝たきり者（座位不可）が23%、その他が5%であった。

2. 菌検出試料の採取および検出方法：歯垢試料は、対象者の左側上顎臼歯部5, 6, 7番（第2小臼歯・第1大臼歯・第2大臼歯）相当部を同様にシードスワブ1号にて擦過後、キャリブレア・チューブに投入する。その微生物の有無は培養法にて同定した。それぞれの微生物が検出された人数の全体における割合を算出した。有意差検定は、1および5%危険率で χ 自乗検定を行った。

3. 全身疾患の既往歴：対象者の全身疾患の既往歴は、脳血管疾患、心疾患、高血圧、糖尿病、肝臓疾患、腎臓疾患、パーキンソン病、悪性腫瘍、整形外科疾患などが記載されたチェックシートに、対象者が内科医によって診断された疾患を記録することにより判定された。

結果および考察

歯垢中で*Candida albicans*、*Enterobacter cloacae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas* sp.などが高率に検出された。菌と歯数との相関性について検討した結果、20本以上の歯を有する要介護高齢者は、*C. albicans*、*Pseudomonas* sp.が0本の

高齢者より高率に検出された。また*Pseudomonas sp.*検出群において、歯数10本以上の高齢者の心疾患を有する割合（58％）は、0や1～9本の高齢者（15％、25％）に比べ有意に高い事が明かとなった。日和見菌を蓄積しやすい要介護高齢者は、歯が20本あると口腔ケアが自力で難しい事に加え介護者による口腔清掃でも取り外し可能な義歯の洗浄よりも困難である。従って、本結果のように歯数が多い程*C. albicans*, や *Pseudomonas sp.*の検出される割合が高くなったと考えられる。歯数の多い高齢者程 *Pseudomonas sp.*の検出と心臓疾患との間に相関が認められたことから、*Pseudomonas sp.*が、循環器疾患の発症に関わるような口腔環境を誘導した可能性が示唆された。

結論

重度な寝たきりの要介護高齢者は、体力の低下から菌への抵抗力が低下し、また自力による口腔清掃もおろそかになりがちであることから *Pseudomonas sp.* の感染を受けやすくなった可能性が考えられる。*Pseudomonas sp.* は強くバイオフィルムを形成する菌でもあることから、このような菌を指標として除菌する口腔ケアが必要である。これらの口腔ケアが要介護高齢者の健康増進に役立つことが示唆された。

Key species which associate to the systemic diseases in oral biofilm infection

Hidenobu Senpuku, Akira Sogame*, Eiji Yoshikawa**, Hideo Miyazaki***,
Nobuhiro Hanada

Department of Oral Science, National Institute of Infectious Disease, Tokyo 162, Japan.

**Fukuoka prefecture, Fukuoka 812-0045, Japan.*

***Bio Medical Laboratory, Tokyo 151-0051, Japan.*

****Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Niigata University, Niigata 951-8514, Japan.*

Corresponding author: Hidenobu Senpuku, Department of Oral Science, National Institute of Infectious Disease, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162.

TEL: 81-3-5285-1111, FAX: 81-3-5285-1172, E-mail: hsenpuku@nih.go.jp

Running title: Key species in oral biofilm infection

Senpuku H, Sogame A, Yoshikawa E, Miyazaki H, Hanada N

Key species which associate to the systemic diseases in oral biofilm infection

Community Dent. Oral Epidemiol.

Abstract

The oral cavity is a reservoir for precolonization and infection of systemic organs by pathogenic bacteria. It has become obvious that aging, tooth eruption, hormonal changes, presence of active disease, etc. influence the infection and accumulation of oral bacteria. In addition to the influence of aging on the changes of microflora, we have studied epidemiologically the relation between the requirement for systemic care and the isolation frequency of oral bacteria in the residents of nursing homes. The isolation frequency of *Candida albicans*, some Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Staphylococcus in plaque, and *C. albicans* and *Xanthomonas maltophilia* in pharynx, was significantly higher in the older adults requiring systemic care (mean age, 83.9 years) than those not (71.0 years). In particular, the frequency of *Pseudomonas* sp. and *Serratia marcescens* in plaque was significantly high dependent on the bedridden status in those requiring care. Furthermore, the isolation of *Pseudomonas* sp. including *P. aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, and/or *C. albicans* in the plaque was associated significantly with heart disease. The co-existence of a number of species including opportunistic organisms such as *Pseudomonas* sp. and *K. pneumoniae* in the oral biofilm is a potential indicator of high risk for pneumoniae, heart disease, etc. in the elderly. Therefore, attention to oral hygiene including professional care may diminish the risk of systemic disease.

Keywords: biofilm bacteria, elderly, systemic disease

Hidenobu Senpuku

Department of oral science, National Institute of Infectious Disease

1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640

Japan

Introduction

In Japan, the population of older adults is increasing rapidly while the birth rate is decreasing. The elderly will account for 25% of the population by 2025. The number of bedridden older adults requiring systemic care is also increasing in residential and nursing homes. In the UK, some investigators have reported that the institutionalized elderly have poorer oral health than those who live independently at home (1, 2). The changes in oral microflora related with poor oral health include an increase in the prevalence of some bacteria and may also contribute to the development of pneumonia (3). Aspiration of bacteria in oropharyngeal flora into respiratory tract is a risk factor for bacterial pneumonia in the elderly and compromised hosts (4). The oral cavity is a reservoir for precolonization and infection of systemic organs by pathogenic bacteria.

Oral biofilms are produced by the sequential attachment of a number of bacteria and dependent on species composition, surface composition and the sequence of attachment (5, 6, 7, 8, 9, 10). The attaching bacteria are able to accumulate on the teeth (10). The biofilm evades antimicrobial challenges by multiple mechanisms involving antibiotics or host immune defenses (11, 12, 13). One reason the biofilm is resistant to antimicrobial agents is the failure of agents to fully penetrate it (11). Moreover, the bacterial community may develop in the oral environment, which presents considerable problems of hygiene and host defense in older adults. The pathogens that are often isolated from the subgingival microbiota (14, 15), such as bacterial pneumonia; *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, etc., may accumulate in the biofilms where they are protected from antimicrobial agents (4, 16) in the elderly with periodontal diseases.

In the present study, the isolation frequency of biofilm bacteria on the tooth surface and pharynx was studied in older adults requiring care. We have sought to obtain frequency data on the prevalence of bacterial pneumonia, nosocomial pneumonia and fungi etc. in oral biofilm bacteria and to determine the influence of various factors such as gender, age, denture-wearing status and bedridden status in nursing homes. Correlations between biofilm bacteria and systemic disease were also analyzed in intensive care patients. The studies provide information on the bacterial frequency in oral biofilm necessary for oral hygiene, during systemic health care, in

older adults in residential and nursing homes.

Materials and Methods

Subjects

The study population was divided into two groups: those requiring care and those not. Two hundred and ninety one older adults requiring systemic care participated in the study, which was conducted at five nursing homes for the aged requiring care (Fukuoka, Japan). They were defined as bedridden and placed in one of four categories: not bedridden, able to support themselves; slightly bedridden, confined to their bed for a short time; moderately bedridden, confined to their bed for a long time; completely bedridden, unable to stand or sit. The subjects requiring care were compared with 464 controls who supported themselves, to determine risk factors. Control subjects live independently in the own homes. Both groups were compared for sex ratio, strain of infection, and underlying disease. These groups are shown in Table 1.

The clinical chart of each subject documented to have an underlying disease during the study period was reviewed. Clinical information of underlying diseases was obtained from the physician's diagnosis or the discharge summary. These diseases were addressed as the reliable indicator to view the systemic problems in the elderly.

Collection of dental plaque samples

Supragingival plaque was collected from the upper right second premolar and first molar teeth by a particular swab postero-anteriorly along the buccal surface. Plaque samples were transferred into 1 ml of reduced transport fluid (0.4% agar, 0.15% thioglycolate/ phosphate buffered saline) in sterile bottles (SEEDSWAB No. 1, Eiken Chemical Co., LTD. Tokyo). The samples were processed within one night of collection on ice. In case of subjects using full dentures, when they remove it from oral cavity, the samples were collected from the same regions of denture. Subjects not having any of the above mentioned teeth provided samples from the opposite teeth.

Collection of pharynx sample

Samples were collected above the pharynx using a particular swab. The samples were transferred into 1 ml of reduced transport fluid (0.4% agar, 0.15% thioglycolate/ phosphate buffered saline) in sterile bottles (SEEDSWAB No. 1, Eiken Chemical Co., LTD. Tokyo) and processed within one night of collection on ice.

Identification of bacteria and fungi

The plaque and pharynx samples were placed in transport fluid and brought to the Bio Medical Laboratory (Tokyo, Japan). The nutrient agar containing the sample was gently shaken and inoculated onto a chocolate agar plate, blood agar plate, OPA staphylococcus plate and drigalski agar plate (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd. Tokyo, Japan). The plate was incubated in an atmosphere of 5% CO₂ in H₂ at 37 °C, for 24 – 48 hours. Representative bacterial colonies from each plate were gram stained and identified by a standard microbial method (17). The bacteria and fungi that were presented in the plaque and pharynx samples are listed in Table 2. These organisms responsible for pneumonia were chosen for the study. The species isolated in the sample of many subjects were shown in the results. These bacteria and fungi were identified by using the detection plates, *Staphylococcus aureus* [Methicilin sensitive (MSSA) and resistant (MRSA)] by PS latex, rabbit plasma, and MRSA screening plate (Nippon Becton Dickinson Co), *Pseudomonas* sp. by VITEK [BioMérieux Vitek Japan (BVJ), Tokyo], β -streptococcus by Seroidenstrepto kit (Eiken), API strepto (BVJ), and VITEK (BVJ), *Streptococcus pneumoniae* by Streptococcus identification disk (Nippon Becton Dickinson Co), *Haemophilus influenzae* by Heamophilus ID4 plate (Nippon Becton Dickinson Co), *Serratia marcescens* by VITEK (BVJ), and *Candida* sp. by Candida check (Iatron Laboratories Inc., Tokyo) etc..

Statistical procedures

Data for those subjects requiring and those not requiring care were compared by the χ^2 test for equal or unequal variation. P values of <0.05 were considered significant.

Results

The isolation frequency of bacteria in dental plaque and pharynx

The isolation frequency of microbial infection in dental plaque and pharynx samples from the two groups is shown in Table 3. The frequencies of *C. albicans*, *E. cloacae*, *Pseudomonas* sp. except for *P. aeruginosa*, *X. maltophilia*, *K. oxytoca*, *S. aureus* (MSSA, MRSA), *P. aeruginosa* and β -streptococcus (type B) from dental plaque samples were significantly higher in the elderly requiring care than those not [107/291(37%) vs 135/464 (30%), $p<0.05$; 45/291(16%) vs 26/464 (6%), $p<0.01$; 41/291(14%) vs 27/464 (6%), $p<0.01$, etc.]. *C. albicans* and *K. pneumoniae* in the pharynx samples were also isolated significantly more often in those requiring care [83/215 (39%) vs 101/453 (27%), $p<0.05$ and 35/215 (16%) vs 40/453 (9%), $p<0.01$]. In contrast, *A. calcoaceticus* from dental plaque samples and *Pseudomonas* sp. from pharynx samples had significantly lower frequencies in the older subjects requiring care [8/291 (3%) vs 41/464 (9%), $p<0.01$ and 7/215 (3%) vs 35/464 (8%), $p<0.01$]. There were no significant differences in the isolation frequency of CNS, *S. marcescens* and *C. parapsilosis* from dental plaque and pharynx samples between the two groups. The strains of group A streptococci associated with throat infection could attach much better to human oral epithelial cells than to rodent cells and this correlated with their natural host preference (18). However, the strain could not be detected in all samples (data not shown). Other microbial strains were isolated less frequently (<1%) from dental plaque and pharynx samples in both groups. There were no significant differences in the isolation frequency of any microbial strain between males and females of the two groups. For evaluating the correlation between bedridden status and microbial infection in dental plaque samples (Table 4), these bacteria were isolated from four groups [Not Bedridden, 29/278 (10.4%); Slightly, 88/278 (31.7%); Moderately, 94/278 (33.8%) and Completely, 67/278 (24.1%)]. *Pseudomonas* sp. except for *P. aeruginosa* were isolated ($p<0.01$, vs None) from 15 (17%) of 88 subjects (Slightly Bedridden) and 14 (15%) of 94 subjects (Moderately). *S. marcescens* was also isolated ($p<0.05$, vs Not Bedridden) from 7 (10%) of 67 subjects (Completely). Being bedridden, however, was found to significantly decrease the frequency of isolation of *C. parapsilosis*. There was no significant difference among the bedridden status in the other strains such

as *C. albicans*, *K. pneumoniae* and *X. matophilia* etc. .

The correlation between systemic disease and microbial infection in oral samples

The main underlying diseases for the 291 subjects requiring care were cerebrovascular disease (n=150, 51.5%), hypertension (n=117, 40.2%), heart disease (n=53, 18.2%), diabetes (n=25, 8.6%), hepatic disease (n=3, 1.0%), kidney disease (n=5, 1.7%), Parkinson's disease (n=10, 3.4%), orthopedic disease (n=34, 11.7%), rheumatism (n=8, 2.7%) and malignant tumor (n=10, 3.4%). The correlation between the main type of bacteria isolated in dental plaque and pharynx samples from the elderly requiring care, and the various underlying diseases, was analyzed by chi square. A comparison of the isolation frequency between infected (*C. albicans* or *K. pneumoniae*) and control dental plaque samples from those requiring care showed only one underlying condition: Heart disease [31/127 (24%) vs 22/164 (13%), $p < 0.05$], and in pharynx: hypertension [54/103 (52%) vs 41/114 (36%), $p < 0.01$]. There was no difference in the incidence of other diseases between the two groups.

The comparison between *C. albicans* and *K. pneumoniae* infection in dental plaque samples, and heart disease was studied. The isolation frequency of *C. albicans* or *K. pneumoniae* was significantly higher in the older subjects with heart disease than for the control [32/139(23.0%) vs 21/152(13.8%), $p < 0.05$]. The isolation frequency of only *C. albicans*, only *Pseudomonas* sp. and, *C. albicans* and *Pseudomonas* sp. tended to be higher for those with heart disease than for the control (data not shown). There was no difference in the incidence of other diseases between the two groups. Some of the subjects requiring care (99/291, 34%) were using full dentures which were susceptible to microbial infection. However, the isolation frequency of various bacteria was not significantly different between those using full dentures and the control (data not shown).