

A. 宛名：分担研究者 宮崎秀夫

B. 定課題名：平成14年度医療技術評価総合研究事業
「口腔保健と全身的な健康状態の関係について」

C. 研究協力課題名：「高齢者の口腔カンジダの疫学調査」

D. 研究協力者：前田伸子, 大島朋子, 王 晶, 安成詩子, 浪越智子
鶴見大学歯学部口腔細菌学講座

E. 研究目的：

口腔常在真菌であるカンジダは潜在的な病原性を持ち、抵抗力の減弱した宿主では日和見感染症の原因になることが良く知られている。また、口腔衛生のレベルが高いほど、本真菌の分離率が低下することから、口腔衛生の指標として利用価値が高いことが指摘されている。

本研究は高齢者の口腔の健康を守るために、口腔カンジダの保有状況（分離率）を調査し、保有状況（分離率）と口腔診査やアンケート調査の結果との相関を調べ、カンジダを一定数以下にコントロールする方法を見出すことを目的としている。

F. 研究方法：

新潟市に住む満74歳の高齢者366名（男性191名、女性175名）の舌背から滅菌綿棒で試料を採取し、クロモアガー（関東化学）上に塗抹し、25-30°Cで2日間培養した。培養後、クロモアガー上にカンジダのコロニーが検出された者をカンジダ保有者とし、そのコロニー数を1試料あたりの菌数（Colony forming unit; CFU）として測定した。クロモアガー上のコロニーはその色調と形態的特徴から、*Candida albicans*（緑色）、*C. glabrata*（紫色）、*C. tropicalis*（青色）、*C. krusei*（中心部ピンクのラフ型）、*C. parapsilosis*（光沢のある白色）の5菌種に分類した。上記5菌種以外のコロニーは簡易同定キットであるアピCオクサノグラム（bio Merieux）で同定し、もっとも病原性の強い *C. albicans* に関してはPCR法でさらに genotyping し *C. albicans* A, B, C と D (*C. dubliniensis*) に分類した。カンジダ分離率、菌数、各菌種の分離率と口腔内診査およびアンケート調査の結果の相関関係を調べた。

G. 研究結果・考察：

366人中127名（65.3%）からカンジダが分離され、女性からの分離率（73.1%）が高く、男性（58.1%）との間に統計学的に有意差があった（student- t test; $p < 0.05$ ）。菌種別の分離率は *C. albicans* がもっとも高く（77.8%）、次いで *C. glabrata*（40.2%）、*C. parapsilosis*（8.8%）、

C. tropicalis, (5.9%), *C. krusei* (2.9%) であった。欧米で行われた高齢者を対象としたカンジダの疫学調査で80歳代で *C. glabrata* の分離率が70歳代よりも統計学的に有意に高いという結果があることから、今回の被験者を経年的に調査し、同一個体でカンジダの菌種が加齢により変化するかどうかを検討する必要があると思われた。口腔診査およびアンケート結果とカンジダの分離率との相関を見た結果、義歯の有無 ($r=0.323$, $P<0.0001$), 処置歯数 ($r=-0.364$, $P<0.001$), 残存歯数 ($r=-0.347$, $P<0.001$), Bleeding on probing (BOP; $r=0.121$, $P<0.05$), 口腔乾燥感の訴え ($r=0.115$, $P<0.05$) と相関があることが分かった。カンジダ分離率ともっとも正の相関が強かった義歯に関して、さらに検討した。義歯 (+) の被験者のカンジダ分離率は94.1%, 義歯 (-) では77.2%で両者間に統計学的に有意な差が認められた (χ^2 -test, $p<0.0001$)。また、義歯の有無・義歯の種類別にカンジダの平均菌数 (CFU/試料) を比較したところ、義歯 (-); 9.41 ± 29.27 , 橋義歯 (+); 18.84 ± 85.63 , 部分床義歯 (+); 39.55 ± 87.18 , 全部床義歯 (+); 73.29 ± 118.43 で、義歯を装着していない被験者で菌数をもっとも低く、なんらかの補綴物を装着している被験者で菌数が高く、全部床義歯装着者がもっとも高い値を示すことが分かった。なお、義歯 (-), 橋義歯 (+), 部分床義歯 (-) と全部床義歯 (+) との2群間で統計学的に有意な差 (student-t test, それぞれ $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.05$) が認められた。もっとも病原性が高い *C. albicans* に関して、さらに詳しく行った genotyping の結果は genotype A; 56.35%, genotype B; 13.81% genotype C; 18.23%, genotype D (*C. dubliniensis*); 11.6% であった。日本人における *C. dubliniensis* の分離率は3~5%との報告 (平成14年, 医真菌学会) があるが、今回、我々が行った調査は11.6%と2倍以上高率であった。

H. 研究発表:

1. 論文発表

- 1) 菅田英喜, 武藤隆継, 前田伸子他; 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, 老年医誌, 14; 297-306, 2000
- 2) 武藤隆継, 菅田英喜, 前田伸子他; 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, 口腔衛生誌, 50; 351-360, 2000
- 3) 森田一三他; 特別養護老人ホームにおける口腔のケアの効果測定の研究, 口腔衛生会誌, 50; 811-817, 2000
- 4) E. Honda; Oral microbial flora and oral malodour of the institutionalized elderly in Japan. Gerodontology 18; 65-72, 2001

2. 著書・執筆

- 1) 前田伸子; 常在真菌 *Candida* の臨床評価 the Quintessence Year Book 1999, 17-22
- 2) 前田伸子; 口腔内細菌の検査法と評価法, 「高齢者の口腔ケア 知識と実践」 鈴木俊夫編, 日総研出版, 2000

- 3) 前田伸子, 武藤隆継, 菅田英喜他; 高齢者の口腔内における *Candida* の分離頻度の調査, 8020 者のデータベース構築について, 2000, 7.15

4. 学会発表

- 1) 菅田英喜, 武藤隆継, 松本亀治, 森戸光彦, 前田伸子; 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, 第 10 回日本老年歯科医学会, 1999, 6.16~18
- 2) E. Honda, T. Mutoh, K. Matsumoto, M. Morita, N. Maeda; Study on oral microflora of elderly people 78th IADR, 2000, 4.5~8
- 3) 前田伸子; 教育講演: 有病者における口腔常在菌について—口腔常在真菌 *Candida* の臨床的重要性について— 第 10 回日本有病者歯科医療学会, 2001, 2.25
- 4) E. Honda, M. Ishikawa, N. Maeda, T. Mutoh, M. Morita, Y. Ando, K. Shibuya and H. Miyazaki: An Investigation of *Candida* Carriage and Halitosis in Elderly People, 30th AADR in Chicago, 2001, March
- 5) E. Honda, T. Mutoh, N. Maeda, M. Morita, M. Ishikawa and K. Shibuya: Oral Microbial Flora and Denture Wearing of Elderly People, 79th IADR in Chiba, 2001, June
- 6) E. Honda, N. Maeda, M. Ishikawa, T. Mutoh, Y. Ando, K. Shibuya, H. Miyazaki and M. Morita: Elderly people who produce high amount of CH₃SH harbor low number of *Candida*, 5th International Conference on Breath Odor in Tokyo, 2001, July
- 7) E. Honda, T. Mutoh, N. Maeda, M. Morita, M. Ishikawa and K. Shibuya: A study on relation between dependency and oral status of elderly people, The 17th congress of the international association of gerontology in Vancouver, 2001,
- 8) E. Honda, N. Maeda, D. Kato, J. Wang and M. Morita: A longitudinal study on oral carrier in elderly people, 80th IADR in San Diego, 2002, March,

20021294

以降 P.81-P.115は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
下記の資料をご参照ください。

**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** 譽田 英喜, 武藤 隆嗣, 前田 伸子, 松本 亀治, 森戸 光彦
老年歯科医学(0914-3866)14 巻3号 Page297-306(2000.03)

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, 譽田 英喜, 前田 伸子, 松本 亀治, 森戸 光彦
口腔衛生学会雑誌(0023-2831)50 巻3号 Page351-360(2000.07)

特別養護老人ホームにおける口腔ケアの効果測定の研究
森田 一三, 中垣 晴男, 小原 久和, 東松 信平, 中島 俊朗, 渡辺 喜則,
太田 憲明, 前田 伸子, 山中 克己, 柴田 享子
口腔衛生学会雑誌(0023-2831)50 巻5号 Page811-817(2000.10)

Oral microbial flora and oral malodour of the institutionalised
elderly in Japan. Eiki Honda Gerodontology. 2001 Dec;18(2):65-72.

A. 宛名：分担研究者 宮崎秀夫 殿

B. 指定課題名：平成14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：「高齢者における口腔微生物感染と口臭との関係」

D. 泉福英信

国立感染症研究所細菌第一部

E. 研究の目的： 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。本厚生労働科学研究費補助金研究の一環として平均 72 才の自立高齢者の口腔内日和見菌の検出を高齢者歯垢、唾液、咽頭などの試料を用いて行った。その結果、咽頭粘膜上、舌上ともに、真菌、腸内細菌、緑膿菌、肺炎幹菌、黄色ブドウ球菌、セラチア菌などが検出された。近年、口腔内の微生物感染症の新しい概念としてバイオフィーム感染症が提唱された。これは、歯面および口腔内組織の表層に付着した細菌などの微生物が菌体外に産生した多糖体に周囲の無機物や有機物が取り込まれて形成される EPS (Extracellular polymeric substance) なかで微生物が増殖コロニーを維持し、歯や口腔組織の表面をフィルム状に被覆した結果として生じる感染症の一型である。この場合、EPS が微生物の付着を助長するだけでなく、バイオフィームという増殖様式そのものが生体防御系や抗菌薬などに対する抵抗性を賦与して慢性持続感染

が生ずることになる。このような口腔内の持続感染病巣から、歯周組織、口腔粘膜、扁桃、気道、そして食道等を経由して遠隔感染を生じたり、場合によっては血行性に様々な臓器での感染症を生じることとなるだけでなく、局所等で生じる免疫応答が全身性の慢性炎症性疾患の発症とその増悪に関与することとなる。高齢者から検出される菌も歯表面でバイオフィームを形成している可能性がある。このように多数の微生物が口腔から検出される高齢者は、強い口臭がある場合が多い。口臭は、糖尿病などの全身疾患を有する人や重度の齲蝕や歯周病をもつ人などから発せられる。また、舌苔も口臭と関係があるという報告もされている。口臭の原因は、口腔微生物による分解産物であると報告されているが、いまだ関連する特定微生物は明らかになっていない。関連菌が特定されれば、それを除去する口腔ケアが可能となってくる。そこで本研究では、口臭と関連する口腔微生物を特定するために、口腔バイオフィーム(歯垢)微生物を検出し口臭との相関性を検討した。口

臭の測定は、主成分である揮発性硫化物 (VSC)が主成分をインディケータとして、硫化水素やメチルメルカプタンなどの濃度の測定を行った。

F. 材料および方法：

1) 対象者

新潟県在住の自立高齢者 67 名、平均年齢 75 才 (女性 23 名、男性 44 名)。

2) 試料採取

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、頬側歯頸部の歯垢をシードスワブ 1 号の滅菌キャップ付綿棒で数回 (5 往復) 擦過し、更に綿棒の綿球を 180 度回転し 5 往復擦過後、キャリブレア・チューブに投入する。試料は (株) ビー・エム・エルへ輸送する。菌の同定は培養法にて行った。

3) 微生物検査

試料の入った溶液をスパイラルシステムを用いてコロンビア 5% ヒツジ血液寒天培地 [Nippon Becton Dickinson Company (BD)], BTB 培地 (BD), チョコレート寒天培地 (BD), OPA ブドウ球菌寒天培地 (BD), PASA 培地 (BD), ブルセラ血液寒天培地 (栄研), サブロー培地 (BD) へ植菌し、24~48 時間の初代分離培養を行った後、コロニーを釣菌し、以下に示す確認培地および同定キットを用いて、起炎菌を中心に目的菌の同定を行った。① MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) および MSSA

(methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*) : PS ラテックス (栄研) ・ウサギプラズマ (栄研) ・MRSA スクリーニング培地 (BD), *Pseudomonas aeruginosa* , *Klebsiella pneumoniae* , *Serratia marcescens* , *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* および他のグラム陰性桿菌 : VITEK [bioMerieux vitek Japan (BVJ)], β 溶連菌 : セロアイデンストレプトキット (栄研) ・rapid ID32 strep API (BVJ) , *Streptococcus pneumoniae* : 肺炎球菌鑑別用ディスク/タキソ P ディスク (BD) ・ストレプト (BVJ) , *Haemophilus influenzae* : ヘモフィルス ID 4 分画 (BD), *Candida sp.* : カンジダチェック (ヤトロン)

4) 口臭測定

ポータブルガスクロマトグラフィー (Takasago Electric Corporation) により硫化水素とメチルメルカプタンを測定する。

その方法は、針無し注射器の先を歯で固定し、唇で注射器全体を包み口外の空気が入らないようにする。口腔の息を 30 秒間吹き込み、注射器のたまったガスを一度口腔へ戻し、再度同じように口腔の息を注射器に吹き込んでいく。それを、ポータブルガスクロマトグラフィーに注入する。

G. 結果：

1. VSC の濃度

硫化水素とメチルメルカプタンの濃度の結果は、表 1 に示した。被験者の約 20% 以上は、硫化水素臭の高いグループ (10ng/

10ml 以上)であった。硫化水素の濃度は、男性よりも女性の方が高い傾向であったが、有意差はなかった。また被験者の半分が、メチメルカプタン臭の高いグループ (0.5 ng/10 ml 以上) であった。メチメルカプタンの濃度は、女性の方が男性よりも有意に高かった。

2. 微生物の同定

歯垢中微生物の同定結果は、表 2 に示した。好気性菌中、 α -Streptococcus と Neisseria sp.は、すべての被験者歯垢から検出された。また被験者の 43%から、Candida sp.が検出された。他の好気性菌の検出率は、10%以下であった。

嫌気性菌において、Capnocytophaga sp.のみがすべての被験者から検出された。また、被験者の 53.7% から *Prevotella melaninogenica* が検出された。*Fusobacterium* sp. と *Prevotella corporis* は、被験者の 4分の1 から検出された。

3. 微生物の検出と口臭との関連性

微生物の検出と口臭 (揮発性硫化物: 硫化水素、メチメルカプタン) との関連性は、Mantel-Haenszel 試験により解析した (表 3)。硫化水素が 10 ng/ml 以上認められた被験者において、*P. melaninogenica* が 10 ng/ml 以下の被験者よりも有意に高く検出された。*Fusobacterium* は、有意差はないがオッズ比で 3.5 倍も高く 10 ng/ml 以上の被験者が 10 ng/ml 以下の被験者よりも高く検出された。メチメルカプタンにおいては、有意に関連性のある菌の検出は認めら

れなかった。

H. 考察: 口腔微生物と口臭の関連性を検討するために揮発性硫化物の濃度を測定して検討したこの研究は、いままでにあまり例がなく口臭の原因微生物を明らかにする上で重要である。本研究の結果、嫌気性菌の *P. melaninogenica* が有意に硫化水素との関連を示し、*Fusobacterium* も有意差はないが関連する傾向が認められた。*Fusobacterium* は歯周ポケットや舌からも分離され、硫化水素を産生する菌として考えられている。*P. melaninogenica* や *Fusobacterium* はバイオフィルムを形成する菌でもあり、これらによるバイオフィルム形成が他の硫化水素を産生する菌をバイオフィルム内に取り込んでいるのことも考えられる。いづれにしても、これらの菌を指標にして歯垢中のこれらの菌を除去する口腔ケアを行うことは高齢者の口臭を抑制するために重要である。このような研究は、高齢者の QOL の向上につながり、口腔保健を進めていく上で役立つと考えられる。

I. 研究発表

1) 誌上発表

1. H. SENPUKU, A. TADA, M. TAKADA, T. SATOH, N. HANADA. Reproducibility of oral bacterial isolation in elderly. J. J. Infect. Dis. 55: 61-62. 2002.

2. Y. NOMURA, H. TAKEUCHI, H. SENPUKU,

H. IDA, E. YOSHIKAWA, K. KOYAMA, N. KANAZAWA, N. HANADA. Survey of dental hygienists and health care workers for microorganisms in the oral cavity. *J Infect Chemother.* 8:163-167 2002.

3. H. SENPUKU, A. SOGAME, E. INOSHITA, Y. TSUHA, H. MIYAZAKI and N. HANADA. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology* 2003 in press.

4. M. KAWASHIMA, N. HANADA, T. HAMADA, J. TAGAMI and H. SENPUKU. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. *Oral Microbiol. Immunol.* 2003 in press.

5. 泉福英信、花田信弘：やってみよう微生物・生化学検査；歯科微生物・生化学検査、*デンタルハイジーン*、22: 498-503. 2002.

6. 泉福英信、由川英二：やってみよう微生物・生化学検査；微生物検査の実態、*デンタルハイジーン*、22: 504-510. 2002.

7. 野村義明、武内博朗、西川原総生、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 2；口腔バイオフィルム（歯垢）の性状と解明、*デンタルダ*

イヤモンド. 27: 46 - 49. 2002.

2) 学会発表

1. 野村義明、西川原総生、泉福英信、花田信弘。口腔内日和見病原菌の検出者率調査、第 76 回日本感染症学会、4 月 11、12 日、東京、p. 221, 2002. (#246).

2. 竹原直道、花田信弘、熊谷崇、安細敏弘、安部井寿人、稲葉大輔、宮崎秀夫、豊島義博、野村義明、佐藤 勉、泉福英信、田中宗男、雫石聡、由川英二、口腔保健のための総合的検査項目の検討-歯科医療における臨床検査の使い方-、自由集会、第 51 回口腔衛生学会総会、大阪、9 月 12 日、2002.

3. 金子 昇、泉福英信、花田信弘、宮崎秀夫、80 際高齢者における血漿中抗 PAc(361-386) peptide 抗体価と DMFT との関連、第 51 回口腔衛生学会総会、大阪、9 月 12 日~9 月 14 日、2002. 52: 450-451 (D-24).

4. 安部井寿人、山口幸子、花田信弘、泉福英信、PMTC+3DS によるミュータタンスレンサ球菌除菌の臨床研究、第 51 回口腔衛生学会総会、大阪、9 月 12 日~9 月 14 日、2002. 52: 514-515 (E-23) .

表 1 被験者の VSC 濃度

(1) 硫化水素

	Men	Women	Total
<5 ng/10ml	25 (56.9)	9 (39.1)	34 (50.7)
5-9.9 ng/10ml	13 (29.5)	8 (34.8)	21 (31.3)
10-14.9 ng/10ml	4 (9.1)	4 (17.4)	8 (11.9)
15 ng/10ml<	2 (4.5)	2 (8.7)	4 (6.0)

(2) メチルメルカプタン

	Men	Women	Total
<0.5 ng/10ml	28 (63.6)	7 (30.4)	35 (52.2)
0.5-2 ng/10ml	9 (20.5)	8 (34.8)	17 (25.3)
2 ng/10ml<	7 (15.9)	8 (34.8)	15 (22.4)

表 2 微生物の検出率

(1) 好気性菌

	Number	Percentage
<i>α-Streptococcus</i>	67	100
<i>Neisseria sp.</i>	67	100
<i>Candida sp.</i>	29	43.3
<i>Crynebacterium</i>	5	7.5
<i>E. clocae</i>	4	6.0

(2) 嫌気性菌

	Number	Percentage
<i>Capnocytophaga sp.</i>	67	100
<i>P.melaninogenica</i>	36	53.7
<i>Fusobacterium</i>	18	26.9
<i>P. corporis</i>	15	22.4
<i>P. intermedia</i>	6	9.0

表 3 硫化水素濃度と検出微生物との関連性

	≤ 10 ng/10ml No. (%)	10 ng/10ml< No. (%)	OR	P
好気性菌				
<i>Candidasp.</i>	25 (45.5)	4 (33.3)	0.562	0.394
<i>Corynebacterium</i>	5 (9.1)	0 (0)		
嫌気性菌				
<i>P.melaninogenica</i>	26 (47.3)	10 (83.3)	5.305	0.043
<i>Fusobacterium</i>	12 (21.8)	6 (50.0)	3.506	0.062
<i>P.corporis</i>	12 (21.8)	3 (25.0)	1.310	0.720
<i>P.intermeccicus</i>	5 (9.1)	1 (8.3)	1.080	0.946

Relationship between VSC concentration and oral bacteria species detection in the elderly

Hide Nobu Senpuku* DDS, PhD

Chief Researcher, Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Akio Tada DDS, PhD

Head Dentist, Chiba City Health Center
1-3-9, Saiwai, Mihama-ku, Chiba 261-8755, Japan

Takayuki Yamaga DDS, PhD

Assistant Professor, Division of Preventive Department of Oral Health Science, Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University, 2-5274, Gakkocho-Dori, Niigata, 951-8514, Japan

Nobuhiro Hanada DDS, PhD

Director, Department of Oral Health, National Institute of Public Health, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Hideo Miyazaki DDS, PhD

Professor, Division of Preventive Department of Oral Health Science, Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University, 2-5274, Gakkocho-Dori, Niigata, 951-8514, Japan

* : To whom correspondence and reprint requests are to be sent.

ABSTRACT

Objective. This study evaluated the relationship between bacteria species detection and volatile sulfide compounds (VSC) concentration in the elderly.

Study design. Sixty-seven elderly, aged 75, participated in this study. They were functionally independent and dentate. VSC (H_2S and CH_3SH) concentrations in breathing of subjects were measured using portable gas chromatography. Oral bacteria samples were taken from dental plaque and Identification of bacteria species was accomplished under standard methods.

Results. Less than 20% of subjects showed more than 10ng/10ml of H_2S (severe odor level). The detection rate of *P. melaninogenicus* were significantly higher in elderly with more than 100ng/10ml ($p=0.043$).

Fusobacterium are more likely to be found in elderly with more than 10ng/10ml.

Conclusions. The results suggest that *Fusobacterium* and *P. melaninogenicus* may be involved in the production of H_2S in the oral cavity of elderly.

INTRODUCTION

In recent years, the concern on oral malodor has been increasing. Oral malodor includes stench resulted from general disease, for example, diabetic mellitus, heavy caries and periodontal disease, and physiological malodor of healthy adults (1-7). Oral care for elderly persons is important for prevention not only of oral disease but of general disease, for example, aspiration pneumonia (8-10). Oral malodor give others unpleasant feeling, so it make care for elderly inactive. Therefore, oral malodor is unavoidable problem for performing oral care smoothly.

Volatile sulfide compounds (VSC) has been considered to be the main component of oral malodor and several VSC have been used for the indicator of oral malodor (4, 11, 12, 13, 14). There have been several reports on the VSC production ability of bacteria species (14,15,16,17,18,19,20). But there has been no report on the relation between oral bacteria species detection and oral VSC concentration in breathing. It is necessary as a indicator for oral care of elderly to elucidate oral bacteria species which is concerned with VSC concentration in epidemiological study.

Dental plaque is thought to be one of dominant contributor for oral malodor (15,16,21). We have reported that dental plaque, saliva, tonsil and tongue had similar bacteria flora each other (22,23). Moreover, dental plaque has been noticed to be a biofilm, harboring various pathogenic bacteria species, which is important problem for geriatric medicine (24). Various bacteria species, containing pathogenic bacteria species, were isolated from

dental plaque of elderly (22, 25, 26). In this study, we analyzed the relation between VSC concentration and bacteria species detection in the dental plaque of the elderly.

Methods

Subjects

Sixty seven elderly people aged 75 years old (44 males and 23 females) from Niigata prefecture in Japan participated in this study, which was conducted in June, 2002. All of them were functionally independent and dentate.

Oral malodor measurement

We used H_2S and CH_3SH concentration as the indicator of oral malodor. The VSC concentrations in breathing of subjects were measured as follows.

- 1 Subjects breathe deeply and take the disposal syringe between their teeth for 30 sec.
- 2 Inhalate gas from the oral cavity till the syringe is filled with gas, then discharge in the oral cavity once.
- 3 Finally, inhalate gas from the oral cavity again and inject gas into portable gas chromatography (Takasago Electric Co., Ltd, , Japan).

Identification of oral bacteria

Samples were taken from dental plaque on upper molar teeth or upper molar portions of dentures. The plaque samples were placed in transport fluid (0.4% agar, 0.15% thioglycolate/phosphate buffered saline) and taken to Bio Medical Laboratory (Tokyo, Japan) for analysis. For aerobic bacteria species detection and identification, each sample was poured directly onto chocolate agar, OPA staphylococcus, and drigalski agar plates (Nippon Decton

Dickinson Co., Ltd, Tokyo, Japan) using a stick. The plates were incubated in an atmosphere of 5% CO₂ in H₂ at 37°C for 24-48 hours. Representative microbial colonies from each plate were gram stained and isolated by identification of their characteristic appearance, as well as hemolytic, catalytic, and oxidase reaction (9). Those species found in a majority of the subjects were suspended in 1 ml of 0.5% saline, gently shaken, and the results are shown. The following bacteria were identified in the detection plates: *Staphylococcus aureus* [Methicillin sensitive (MSSA) and resistant (MRSA)] by PS latex, rabbit plasma, and MRSA screening plates (Nippon Becton Dickinson Co); *Pseudomonas sp.* by VITEK [BioMerieux Vitek Japan (BVJ), Tokyo]; *Haemophilus influenzae (H. influenzae)* by a Haemophilus ID4 plate (Nippon Becton Dickinson Co) and *Candida* species by Candida check (Intron Laboratories Inc., Tokyo). For anaerobic bacteria species detection and identification, each sample was poured directly onto HK agar plate and incubated for 48-72 hour under anaerobic condition by gas pack system. Representative microbial colonies from each plate were gram stained and isolated by RapID ANA system. Each colony was suspended in 0.6% KCl, 0.05% CaCl₂, 0.16mM NaOH. The suspension was inoculated in 10 separate detection medium (1: 0.4% Urea, 2: 0.1% p-Nitrophenyl- β , D-disaccharide, 3: 0.1% p-Nitrophenyl- α , L-arabinoside, 4: 0.1% p-Nitrophenyl- β , D-galactoside, 5: 0.1% p-Nitrophenyl- α , D-glucoside, 6: 0.08% p-Nitrophenyl- β , D-glucoside, 7: 0.08% p-Nitrophenyl- α , D-galactoside, 8: 0.08% p-

Nitrophenyl- α , L-fucoside, 9: 0.1% p-Nitrophenyl-n-acetyl- β , D-glucosaminide, 10: 0.1% p-Nitrophenyl-phosphate) and incubated in an atmosphere of 5% CO₂ in H₂ at 37°C for 4-6 hours (primary test). At secondary test, 0.01% 3-Phenyl-methylaminoacrolein, 0.1% Hydrochloride acid, 1.0% Acetic acid was added to reaction mixture 3-9 and INNOVA Indole to reaction mixture 10. Bacteria species were identified by both the results of primary test and secondary test. The levels of detection for each organism were determined according to the manufacturer's instructions.

Statistical methods

In a series of our oral malodor measurement, several examiner have smelled severe odor at the concentration about 10ng/10ml of H₂S and about 0.5 of CH₃SH. Therefore, concentration of H₂S and CH₃SH was classified into two groups ($\leq 10\text{ng}/10\text{ml}$, $10\text{ng}/10\text{ml} <$ and $\leq 0.5\text{ng}/10\text{ml}$, $0.5 \text{ ng}/10\text{ml} <$). The relation between VSC concentration and detection of bacteria species was analyzed using a gender-adjusted Mantel-Haenszel test. Difference at the .05 level was considered statistically significant. SPSS for Windows (version 10.0) was used in performing all statistical analyses.

Result

1. The distribution of VSC concentration

The distribution of H₂S and CH₃SH concentration was shown in Table 1. Less than 20% of subjects showed severe odor level in H₂S concentration (more than 10ng/10ml of H₂S). Women had higher rate of more than 10ng/10ml than men, but significantly difference was not found between genders. With regard to CH₃SH, about half of subjects had severe odor level of CH₃SH concentration (more than 0.5ng/10ml of CH₃SH). The concentration of CH₃SH of women was significantly higher than that of men.

2. The detection of bacteria species

The detection rate of major microorganisms from dental plaque, as determined using the manufactures instruction, are shown in Table 2. In aerobic microorganisms, *α-Streptococcus* and *Neisseria* sp. were detected in all subjects. *Candida* sp. was isolated from about 43% of subjects (43.3 %). The detection rate of other bacteria species were less than 10%.

In anaerobic bacteria species, only *Capnocytophaga* sp. were detected in all subjects. *P. melaninogenicus* was isolated from about half of subjects (53.7 %). *Fusobacterium* species and *P. corporis* were isolated from about quarter of subjects.

3. The relation between VSC concentration and detection of bacteria species

We analyzed the relation between VSC concentration and detection of each bacteria species by using Mantel-Haenszel test. Subjects with more than 10ng/10ml showed significantly higher detection rate of and *P.*

melaninogenicus than subjects with less than 10ng/10ml (Table 3). In *Fusobacterium* , though not statistically significant, the odds of detection among more than 10ng/10ml were 3.5 times greater than the odds among the less than 10ng/10ml (OR=3.5 and 95% CI=0.939,13.090). In aerobic microorganism species, significant relation was not seen. CH₃SH concentration was not related with microorganism detection (data not shown).

Discussion

The study on the investigation of bacteria species concerned with oral malodor has been mainly performed by measuring VSC production ability of laboratory strain of oral bacteria species (15,16,18). But oral bacteria flora depends on age and oral condition. Therefore, the research for oral malodor needs to examine VSC concentration and oral bacteria species detection simultaneously and analyze the relation between them. In this point of view, the present study provides a useful data to prove bacteria species causing oral malodor.

The results of the study indicate that *P. melaninogenicus* had significant correlation with H₂S concentration and *Fusobacterium* are more likely to be correlated with H₂S concentration. It has been reported that *Fusobacterium* had higher H₂S production ability than other bacteria species (16, 18). These reports support our results. *Fusobacterium* are also isolated from periodontal pocket and tongue (27, 28, 29). *Fusobacterium* is thought to distribute in various places of oral cavity by means of saliva flora and cause oral malodor in there. It is discussed that *Fusobacterium* produce H₂S in periodontal pocket and tongue coating as well as dental plaque. With regard to *Prevotella* species, Paryavi-Gholami reported that *P. oralis* are concerned with VSC level in children (30). *P. oralis* was not isolated from the subjects. The oral bacteria flora change with age, which may make difference in bacteria species causing oral malodor among subjects with various age class. *Fusobacterium* and *P. melaninogenicus* are known to contribute greatly for forming biofilm (24).