

A. 分担研究者 石川達也 殿

B. 指定課題名：平成 15 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の総合研究」

C. 研究課題名「口腔の状態と睡眠についての研究」

D. 研究協力者 下野正基 (東京歯科大学教授)
石井拓男 (東京歯科大学教授)
佐藤 亨 (東京歯科大学教授)
吉田友明 (老年歯科医学総合研究所)
飯島国好 (飯島口腔科医院院長)
巽 浩一郎 (千葉大医学部助教授)

研究要旨：

口腔内状態と睡眠の関係、睡眠と健康の関係に関する報告は多いが、口腔内咬合状態と睡眠との関係に関する研究報告は少ない。特に、高齢者の多くが使用している義歯の就寝時における取り扱いに関しては、床下粘膜の安静と血液循環の活性化を図るために義歯を取り外して就寝する指導と、残存歯と粘膜との関係、顎機能、ブラキシズム、就寝時の審美性、動揺歯のスプリントなどを考慮し義歯を使用して就寝する指導の相反する指導がある。しかし、これらの指導は経験則にて行なわれており、義歯の使用あるいは咬合関係の確保が、睡眠状態、睡眠の質などにどのように影響を与えているかを考慮したものではない。

そこで、義歯の使用の有無による咬合確保と睡眠状態および睡眠の質との関係を解明するため、研究方法の確立とその検討をおこなった結果、以下の結論を得た。

- 1) 義歯の使用の有無による咬合の影響を Polysomnography により計測することで睡眠状態を確認することが可能であった。
- 2) 無歯顎症例における就寝時の義歯の取り扱いは、義歯未装着の睡眠より義歯を装着した睡眠のほうが良好な睡眠が得られていることが認められ、就寝時は全部床義歯を装着しているほうが望ましいことが示唆された。
- 3) 無歯顎症例において、義歯装着による咬合の確保と睡眠時無呼吸症候群の関連は認められなかった。

今後さらに症例数を増し、咬合の確保と睡眠状態への影響について検討するとともに、睡眠時無呼吸症候群と顔面形態や咬合との関連についても検討する。

I. 口腔の状態と睡眠について

E. 研究目的

睡眠時に良質の睡眠を確保するためには、局所的には上気道が十分に開存されていることが必要であり、この開存が不十分であることと睡眠時無呼吸症候群発生とは密接な関係のあることが示唆されている¹⁾。また睡眠時無呼吸症候群患者をスプリント使用群と非使用群にわけ、睡眠ポリグラフを用いて睡眠時無呼吸の状況を評価し、さらに診断用歯科石膏模型およびセファログラムによる口腔内形態的特徴との関連を検索した研究では、スプリント使用によって睡眠時無呼吸指数が著明に減少したと報告されている²⁾。そして、スプリントの使用は、小顎症の傾向を示す患者においてより効果的であったとしている。

睡眠と健康について、Breslow L. の生活習慣と健康において、通常睡眠時間は7～8時間であると述べている。一方、1997年から1998年にかけて4県24市町村において実施された8020データバンク調査から、口腔状態と睡眠時間との関係について分析³⁾した結果では、70歳群よりも80歳群の方が睡眠時間8時間以上という人が明らかに多く、いずれの場合も男性が女性より睡眠時間は長いとする傾向にあった。また70歳群、80歳群ともに、現在歯の多い群ほど8時間以上寝るとする割合が少なくなり、7時間未満とする割合が多くなった。この傾向は80歳群の女性でとくに明確であった。無歯顎者は有歯顎者に比べ8時間以上寝るとする人の割合が多く、80

歳群ではその傾向がより明確であった、と報告している。

このように口腔内状態と睡眠の関係、睡眠と健康の関係が報告されているが、口腔内咬合状態と睡眠との関係を報告したものは少ない。とくに高齢者の多くが使用している義歯の就寝時における取り扱いに関しては、床下粘膜の安静と血液循環の活性化を図るために義歯を取り外して就寝する指導と、残存歯と粘膜との関係、顎機能、ブラキシズム、就寝時の審美性、動揺歯のスプリントなどを考慮し義歯を使用して就寝する指導の相反する指導がある。しかしこれらは経験に基づいて判断されており、義歯の使用あるいは咬合関係の確保が、睡眠状態、睡眠の質などにどのような影響を与えているかを考慮したものではない。

そこで、義歯の使用の有無による咬合確保と睡眠状態との関係を解明するため、研究方法の確立の検討を行なった。

F. 方法

被験者はインフォームドコンセントにより本研究の意義を理解し、協力可能であった60歳以上の無歯顎の男性4名、女性1名とした。

睡眠の判定のため、脳波(electroencephalogram : EEG)、眼電図(electrooculogram : EOG)、頤筋電図(electromyogram : chin EMG)の測定を同時に行い、睡眠段階の判定を行うと共に、動脈血酸素飽和度(SaO₂)、いびき、無呼吸などの測定を行い、呼吸情報を記録した。

計測条件は、義歯を装着した就寝を1晩、義歯を装着しない就寝を1晩として、睡眠

状態を計測した。なお睡眠時の計測装置、通常の睡眠場所からの変更、等を考慮し、計測日前日に計測装置等を装着した計測状態と同様の就寝を1日とってもらったこととした。

G. 結果および考察

Polysomnography : clinical report および睡眠ポリグラフィ検査結果から、義歯装着時と未装着時の Total sleep time, Arousal (覚醒回数), Sleep Efficiency (Total sleep/全検査時間), Sleep latency, REM latency, REM sleep, stage 1, 2, 3, 4, 睡眠時無呼吸回数 (Central Apnea, Obstructive Apnea), Lowest SaO₂, Average SaO₂ Minimum, Mean Apnea / Hypopnea duration を比較した結果を表に、各症例の睡眠ステージ結果を図に示す。

各症例において、症例1では Total sleep time (総睡眠時間) は義歯装着時で 386.0 min、未装着時で 285.5 min、Sleep latency (睡眠までの導入時間)、REM latency (REM 睡眠までの時間) は、それぞれ義歯装着時、112.0 min, 152.5 min, 義歯未装着時、39.5 min, 39.0 min であった。また、深睡眠の Stage 3、4 は、義歯装着時に 54.5 min (14.1%)、未装着時では 42.5 min (14.9%) の割合であった。この症例における義歯装着の影響は、Total sleep time (総睡眠時間) の増加、Sleep Efficiency (Total sleep/全検査時間) の増加、Stage 1 の割合の低下が認められ、義歯装着は睡眠状態に良い影響を与えていると考えられた。

症例2では Total sleep time (総睡眠時間) は義歯装着時で 298.5 min、未装着時で 344.5 min、Sleep latency (睡眠まで

の導入時間)、REM latency (REM 睡眠までの時間) は、それぞれ義歯装着時、49.5 min, 153.5 min, 義歯未装着時、60.0 min, 57.5 min であった。また、深睡眠の Stage 3、4 は、義歯装着時に 82.5 min (27.7%)、未装着時では 123.5 min (35.8%) の割合であった。この被験者における義歯装着の影響は Sleep latency (睡眠までの導入時間) の減少という点で認められた。またこの症例は、睡眠時無呼吸低換気回数が 5/hour であったことより、睡眠時無呼吸症候群であることが判明した。

症例3では Total sleep time (総睡眠時間) は義歯装着時で 328.5 min、未装着時で 219.5 min、Sleep latency (睡眠までの導入時間)、REM latency (REM 睡眠までの時間) は、それぞれ義歯装着時、20.5 min, 61.0 min, 義歯未装着時、82.0 min, 177.0 min であった。また、深睡眠の Stage 3、4 は、義歯装着時 44.0 min (13.4%)、未装着時では 27.0 min (12.3%) の割合であった。この被験者における義歯装着の影響は、Sleep latency、REM latency、の短縮、Arousal (覚醒回数) の減少、Sleep Efficiency (Total sleep/全検査時間) の増加が認められた点であり、睡眠がより深くなる傾向が認められた。

症例4では Total sleep time (総睡眠時間) は義歯装着時で 395.0 min、未装着時で 373.5 min、Sleep latency (睡眠までの導入時間)、REM latency (REM 睡眠までの時間) は、それぞれ義歯装着時、39.5 min, 109.0 min, 義歯未装着時、62.5 min, 118.5 min であった。また、深睡眠の Stage 3、4 は、義歯装着時に 55.5 min (14.1%)、未装着時では 42.0 min (11.2%) の割合であ

った。この被験者における義歯装着の影響は、Sleep latency の短縮、Stage 1、Stage 3 の延長と REM sleep の延長、Arousal (覚醒回数) の減少、Sleep Efficiency (Total sleep/全検査時間) の増加であり、義歯装着により睡眠状態の改善が得られた。

症例 5 では Total sleep time (総睡眠時間) は義歯装着時で 245 min、未装着時で 153 min、Sleep latency (睡眠までの導入時間)、REM latency (REM 睡眠までの時間) は、それぞれ義歯装着時、84.5 min, 301 min, 義歯未装着時、98.5 min, 241 min であった。また、深睡眠の Stage 3、4 は、義歯装着時に 11.5 min (4.7%)、未装着時では 50.0 min (32.7%) の割合であった。この被験者における義歯装着の影響は、Sleep latency の短縮、REM sleep の延長、Arousal (覚醒回数) の減少、Sleep Efficiency (Total sleep/全検査時間) の増加という点で認められた。またこの症例は、睡眠時無呼吸低換気回数が 5/hour であったことより、睡眠時無呼吸症候群であることが判明した。

睡眠・覚醒リズムの Total sleep time (総睡眠時間)、Arousal (覚醒回数) における検討において、Total sleep time (総睡眠時間) は、成人では単相型睡眠、高齢者においては多相型睡眠で、夜間睡眠時間は減少するといわれている。また 70 歳群よりも 80 歳群の方が睡眠時間 8 時間以上という人が明らかに多く、いずれの場合も男性が女性より睡眠時間を長い、70 歳群、80 歳群ともに現在歯の多い群ほど 8 時間以上寝るとする割合が少なくなり、7 時間未満とする割合が多くなった、さらに 80 歳群の女性により強くその傾向が認められた。

また、無歯顎者は有歯顎者に比べ 8 時間以上寝るとする人の割合が多く、80 歳群ではその傾向がより明確であった³⁾。また一般的には、加齢とともに総睡眠時間は減少するといわれている⁸⁾。しかし Bixer ら⁹⁾ は、年齢が進むにつれて覚醒回数も覚醒時間も増加すると報告しており、この睡眠時間の延長は加齢による睡眠の質の低下が原因していると思われる。今回の研究では、Total sleep time (総睡眠時間) は症例 1、3、4、5 においては義歯装着により延長する傾向が、症例 2 においては減少する傾向であった。

Arousal (覚醒回数) とは脳波が 3 秒以上覚醒反応にある状態をいうが、高齢者になると深夜の覚醒回数の増加と途中覚醒時間の増加が認められるようになる。今回の研究では、症例 1 は増加、症例 3、4、5 は減少する傾向であった。

Sleep Efficiency (Total sleep/全検査時間) は症例 2 において減少するものの、症例 1、3、4、5 は増加する傾向であった

Sleep latency (睡眠までの導入時間)、REM latency (REM 睡眠までの時間) は、一般に短いほうが良いといわれている。Foley ら⁴⁾ は、入眠困難や睡眠の継続困難、さらに早朝覚醒は高齢者の方が若人よりも多いにもかかわらず、高齢者は不健康や慢性疾患等で夜間の睡眠時間と昼寝の時間が若人よりも長くなる傾向にあり、そのためか昼間の眠気を訴える人の割合は若人より少ないとしている。また、睡眠時無呼吸症候群の患者では Sleep latency は短いといわれている。一方、今回の研究では、Sleep latency (睡眠までの導入時間) は症例 1

においては増加するものの、症例 2, 3, 4, 5 においては明らかに減少した。REM latency (REM 睡眠までの時間) は、症例 1, 2, 5 では増加したものの、症例 3, 4 は減少する傾向であった。

睡眠の量的変化である REM sleep、Stage 1, 2, 3, 4 の検討において、REM sleep は、その比率が多いほうが睡眠が深く、睡眠状態がよいといわれている。一般に成人では睡眠時間の 20~25% をしめ、高齢者になると REM sleep の比率は減少し、睡眠は浅く不安定になるといわれている。今回の研究では、症例 4, 5 において増加する傾向にあり、特に症例 5 においては義歯装着による明らかな改善が見られた。他の症例 1 は 14.0%、症例 3 は 26.8% であったが、症例 2 は 6.2% という比率で、先にも述べたが今回の研究で睡眠時無呼吸症候群であることが判明した症例であった。

睡眠ステージにおいて、若年成人群 (平均年齢 20.9±0.8) では REM sleep 23.2±3.9%、Stage 1=15.5±2.3%、Stage 2=50.1±5.2%、Stage 3=8.3±4.3%、Stage 4=10.4±5.1%、70 歳代 (平均年齢 74.6±2.9) では REM sleep=15.1±6.1%、Stage 1=14.4±5.0%、Stage 2=50.5±9.3%、Stage 3=1.3±1.8%、Stage 4=0.1±0.3%、80 歳代 (平均年齢 82.6±2.5) では REM sleep=14.7±5.0%、Stage 1=16.9±7.1%、Stage 2=41.7±8.4%、Stage 3=1.9±2.8%、Stage 4=0.0±0.2% ともいわれている¹⁰⁾。また成人における各 Stage の比率は、Stage 1 は 5~10%、Stage 2 は 50%、Stage 3+4 は 10~20% ともいわれている。今回の研究では、Stage 1 に関して、義歯装着により症例 1 は 10.5%、症例 3 は 9.0% と改善した

が、症例 5 は 36.5% と増加する傾向であった。Stage 3+4 は症例 4 において義歯装着により 11.2% から 14.1% に増加する傾向であったが、症例 2, 4 は義歯装着により減少する傾向であった。

睡眠時無呼吸回数において、Central Apnea は中枢型の無呼吸を、Obstructive Apnea は上気道閉塞による無呼吸を表している。睡眠障害の一因として睡眠時無呼吸症候群があり、そのうち 9 割は閉塞型 (OSAS) といわれるもので、その病因として上気道開存性の低下が考えられている。さらに上気道開存性の改善方法として、歯科的治療装置の有用性が確認されている。無歯顎者の睡眠について、睡眠時の義歯の装着との関係を含め詳細な研究の必要性が認められたことから、無歯顎者の睡眠についての検討をおこなった。

この OSAS の病因となる上気道開存性に影響を及ぼす因子として、形態的異常と機能的異常に分類することができる⁹⁾。形態的異常としては、肥満、顎形態異常、咽喉頭異常、鼻疾患、睡眠体位、機能的異常としては、上気道筋の活動性低下、上気道のうっ血、上気道粘膜の癒着性増加、換気調節機構の異常、性ホルモン⁶⁾などが因子として考えられている。

上気道開存性の改善のための治療としては、保存的治療と外科的治療に大別される。歯科に関連した治療法としては歯科的治療装置 (オーラルアプライアンス) がある⁵⁾。この歯科的治療装置は上気道の機械的 (解剖学的) 狭窄にたいする改善効果があると考えられるが、上気道保持筋 (拡張筋) の活動性との関連もある可能性がある。横隔膜はレム睡眠中もノンレム睡眠中も筋の活

動水準は不変であるが、それ以外の呼吸筋および上気道保持筋の活動性はレム睡眠中に著しく低下する。ノンレム睡眠中は呼吸筋および上気道保持筋の活動性は不変あるいは軽度の低下である。しかし健常人にたいするオトガイ舌骨筋の筋電図活動を調べた Wiegand らの報告⁷⁾は、重力による上気道上の歪みが予想以上に大きいことを示している。

歯科的治療装置はたくさんの方が考案され効果も報告されているが⁵⁾²⁾、この方法が OSAS の治療に効果をあげているということは、口腔の状態や歯の状態が睡眠と密接な関係があるといえる。健常人では、睡眠中の呼吸は主に鼻呼吸によっておこなわれている。鼻腔には圧および気流の変化を感知する受容器が存在し、鼻呼吸時にはこの反射系が働いて吸気時の咽頭周囲筋活動を高め上気道の開存性を保持している。何らかの原因で鼻腔通気性が不良となり、口呼吸状態になると、解剖学的な咽頭腔狭小化が起こるだけでなく、上記の反射系が消失しさらに上気道狭窄が起こりやすくなり、いびきの増強や無呼吸の発生につながる⁵⁾。歯科臨床においては、咬合の改善によって睡眠時の呼吸が口呼吸から鼻呼吸に変わることを経験している。また問診等によって口呼吸患者が熟睡できることは少ないこともわかっている。今回の研究では、義歯装着の有無による影響は認められなかったが、症例 2 は上気道閉塞を伴う閉塞型の睡眠時無呼吸症候群、症例 5 も閉塞型の睡眠時無呼吸症候群を有することが判明した。

Lowest SaO₂, Average SaO₂ Minimum, Mean Apnea / Hypopnea duration におい

ても症例 1、3、4、5 においては義歯装着の有無による影響は認められなかった。

睡眠の重要性が増しつつある昨今、睡眠時無呼吸症候群の患者のみならず、正常者においても睡眠の質の向上すなわち熟睡のための上気道の確保あるいは改善にたいする研究は急務である。また高齢者において咬合の有無が睡眠に関係すると、一つには根尖部を介した脳との神経系の断裂によるものが推測され、また、睡眠時無呼吸症候群と無歯顎との関係も影響が推測されるが、今回の研究においては咬合の確保と睡眠時無呼吸症候群の関連は認められなかった。

今後、睡眠時無呼吸や呼吸のチェアサイドにおける簡便な診断法の確立や共通の間診票の作成、咬合と睡眠の関係、睡眠時の望ましい咬合、咬合と睡眠中の口腔周囲筋の活動性との関連など、科学的な裏付けとなる基礎的な研究の積み重ねがなによりも必要と考える。

H. 結論

義歯の使用の有無による咬合確保と睡眠状態および睡眠の質との関係を解明するため、研究方法の確立とその検討をおこなった結果、以下の結論を得た。

1) 義歯の使用の有無による咬合の影響を Polysomnography により計測することで睡眠状態を確認することが可能であった。

2) 無歯顎症例における就寝時の義歯の取り扱い、義歯未装着の睡眠より義歯を装着した睡眠のほうが良好な睡眠が得られていることが認められ、就寝時は全部床義歯を装着しているほうが望ましいことが示唆された。

3) 無歯顎症例において、義歯装着による咬合の確保と睡眠時無呼吸症候群の関連は認められなかった。

今後さらに症例数を増し、咬合の確保と睡眠状態への影響について検討するとともに、睡眠時無呼吸症候群と顔面形態や咬合との関連についても検討する。

I. 参考文献

- 1) 木村弘：睡眠時無呼吸症候群の概念と予後、日本臨床、58, 1571-1574, 2000.
- 2) Yoshida K: Prosthetic therapy for sleep apnea syndrome. J Prosthetic Dent, 72:296-302, 1994.
- 3) 厚生科学研究「口腔保健と全身的な健康状態の関係」運営委員会編：8020 者のデータバンクの構築について、(財)口腔保健協会、東京、2000
- 4) Foley, D. J., et al: Sleep complaints among elderly persons: an epidemiologic study of three communities. Sleep 18, 425-432, 1995
- 5) 中川健三, 市岡正彦, 小野卓史 編著: いびきと睡眠時無呼吸症候群の歯科的治療 — スリープスプリントの効果と製作法, 砂書房, 東京, 1999.
- 6) 木村 弘: 性ホルモンと呼吸中枢, 呼吸 5(8), 887-896, 1986.
- 7) Wiegand DA et al: Upper airway resistance and genioid muscle activity in normal men during wakefulness and sleep, J Appl Physiol 69:1252-1261, 1990.
- 8) 太田保世編: 日本人の睡眠呼吸障害, 東海大学出版会, 1994.
- 9) Bixler EO, Kales A, Jacoby JA, Soldators CR, Vela-Bueno A: Normal sleep and wakefulness: effects of age and sex in normal sleepness. Intern J Neurosci, 23:33-42, 1984.
- 10) 林 泰, 小林敏孝, 遠藤四郎, 大友英一, 渡辺晴雄: 高齢者の終夜睡眠ポリグラフィ (第3報). 70歳代と80歳代の睡眠の比較. 臨床神経 20: 651-659, 1980.

厚生科学研究補助金（医療技術評価総合研究事業）
総括研究報告書

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

分担研究者 泉福英信 国立感染症研究所細菌第一部室長

研究協力者：公文裕巳（岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 教授）
狩山玲子（岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 助手）
上原慎也（岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 医員）
高柴正悟（岡山大学大学院医歯学総合研究科歯周病態学 教授）
西村英紀（岡山大学大学院医歯学総合研究科歯周病態学 助教授）
姫井猛（岡山県健康づくり財団付属病院 病院長）
久山佳代（日本大学松戸歯学部病理学 講師）
山本浩嗣（日本大学松戸歯学部病理学 教授）

研究要旨：

以下の4つの課題で、口腔微生物と全身の健康の関係を調べた。

- 1) 口腔バイオフィルムとしての Nanobacteria の病原的意義に関する研究
 - 2) 口腔バイオフィルムの感染症として発症する歯周炎の炎症マーカーに関する研究
 - 3) 前立腺癌患者における手術前後における歯垢中の細菌の同定
 - 4) 口腔内環境と嚥下性肺炎の病態変化機構の解明；高齢者における口腔内環境の研究
- 以上の研究班の結果から、口腔微生物の検査および制御法を利用した口腔保健サービスの提供によって高齢者の全身的な健康状態の向上が図れるものと推察された。

A. 研究の目的：

少子高齢化は急速に進み、高齢者および要介護高齢者のケアが社会問題となつてつある。口腔における問題点としては、今までは問題とならなかった常在性の口腔微生物が、高齢化、全身疾患などによる抵抗力の低下により病原性を発揮し肺炎や心臓疾患の原因になったりすることである。よって、高齢者の口腔微生物制御に関わる感染症対策が急務となっている。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ル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、バイオフィル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。そこで、本研究では高齢者の口腔微生物と全身の健康との関係を明らかにすることを研究目的として、詳細に検討を行った。

B. 研究の方法

国立感染症研究所、岡山大学大学院歯学総合研究科と岡山県健康づくり財団付属病院が連携して3研究課題、国立感染症研究所と日本大学松戸歯学部で1研究課題を担当し、それぞれの方法で研究を実施した。

C. 研究の結果・考察

1) 口腔バイオフィルムとしての Nanobacteria の病原的意義に関する研究: Nanobacteria は新しく発見された微生物でありナノサイズ (直径 $0.2\mu\text{m}$ 以下) と微小であることにくわえて、表層に EPS としてリン酸カルシウム (アパタイト) の外被を形成する特徴を有すると報告されている。尿路結石と歯石に着目して Nanobacteria-like organism (NLO) の培養と形態観察を行ったところ、尿路結石からは高率に NLO が検出され分離培養も可能であったが、歯石からは NLO に相当する特徴的粒子は観察されなかった。NLO に関する研究は未だ初期段階であるが、腎結石をはじめとする異所性石灰化が新規微生物によるある種の持続感染症である可能性が示された。その定着や拡がりに歯石が関与しうる可能性、さらには NLO の微生物としての増殖様式などを含めて更なる解析を必要とする重要事項と考えられた。

2) 口腔バイオフィルムの感染症として発症する歯周炎の炎症マーカーに関する研究: 歯周炎が生体にとってどの程度の炎症反応を惹起するかを知る手がかりとして、歯周炎によって末梢の炎症マーカーが上昇するかどうか、その場合上昇したマーカーが歯周治療によって低下するかどうかを検討した。歯周治療に伴って歯周ポケット内の総細菌数が有意に低下するとともに高感度 CRP 値も有意に低下した。血中 TNF- α 濃度も微量ではあるものの有意に低下した。臨床的には全歯周ポケットに占める 4mm 以上のポケットの割合、ならびに 6mm 以上のポケットの割合も有意に改善した。

以上により、重度の歯周炎によって高感度 CRP 値が上昇し、治療に伴って低下することを明らかにした。また、この上昇の程度は健常者において虚血性心疾患のリスクを 2~2.5 倍亢進させるとされる炎症の程度に匹敵するものであることが明らかとなった。

3) 前立腺癌患者における手術前後における歯垢中の細菌の同定: 前立腺癌患者の手術前後における歯垢中の微生物を調査し、手術侵襲や合併症の影響による口腔内微生物の変化につき検討を行った。術後のカンジダ陽性率は、多少増加 (47% から 57% に増加) するを認めた。術前合併症との関係を検討してみると、術前合併症のある 7 例中 4 例 (57%) が術前カンジダ陽性であり、術後カンジダ量が上昇したのは 1 例しかいなかった。合併症のない症例 7 例には術前カンジダ陽性例は 1 名であり、4 例 (57%) は術後カンジダ量が上昇した。カンジダ以外に好気性菌および嫌気性菌の術前術後において、有意な差が認められなかった。

以上より、合併症を有さない患者において、口腔から遠い所に位置する前立腺癌手術であっても手術侵襲が加われば、歯垢中のカンジダ量が上昇するような口腔内細菌叢に変化が生じる可能性が考えられた。合併症を有する患者および手術後の患者は、口腔内細菌叢に変化を生じている可能性があり、術後肺炎などの合併症を予防する観点からも口腔内ケアは重要と示唆された。

4) 口腔内環境と嚥下性肺炎の病態変化機構の解明: 高齢者の口腔剥離細胞診標本にみられたカンジダ属の形態計量学的検索、培養同定検査、唾液緩衝能検査および唾液中 EGF・s-IgA の測定を行った。

要介護高齢者の口腔粘膜からは形態の大きなカンジダが高頻度で検出され、とくに検出グループにおける唾液の評価を緩衝能、s-IgA 定量および EGF 濃度 (という側面から行った結果、いずれも低い値が得られた。以上の結果から、これら唾

液因子はカンジダ病原性を発揮させる環境を構成する 1 要因である可能性が示唆された。

G. 結論:

高齢者の口腔の微生物叢は、健康な成人と比較し変化が生じている。この現象の原因として、高齢に伴う全身的な疾患を背景とする菌抵抗力低下による口腔バイオフィーム形成への影響が考えられることを示した。またバイオフィーム形成を介した炎症性疾患や動脈硬化ならびに腎結石への影響など、口腔を起点とする全身への影響を提示することができた。高齢者の全身的な健康状態を向上を図るためには、口腔バイオフィームを介する問題を把握する検査マーカーが必要である。この点につき、口腔バイオフィーム形成細菌の検出に加え、血中の炎症マーカーおよび唾液中菌制御に関わる因子なども提示することができた。

以上の研究班の結果から、微生物による口腔バイオフィーム制御を目的とする口腔保健サービスの提供によって高齢者の全身的な健康状態の向上が図れるものと推測された。

E. 発表論文、図書、総説

1. Ando, E., Monden, K., Mitsuhashi, R., Kariyama, R., Kumon, H. : Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama*, 2004 in press.
2. Kumon, H., Tomochika, K., Uesugi, K., Yagi N. : Analysis of molecular composition and imaging of *Nanobacteria*. *SPRING-8 User Experiment Report*, No.11: 273, 2003.
3. 狩山玲子, 公文裕巳 (花田信弘 監修) 第1部 バイオフィーム 第1章 生体のバイオフィーム ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学 (クインテッセンス出版, 東京) pp.2-26, 2003.
4. 狩山玲子, 益田美和, 光畑律子, 公文裕巳 : In vitro 実験プロトコール バイオフィーム実験講座 pp.3-19, 2003.
5. 門田晃一, 公文裕巳 : 難治性尿路感染症の課題と展望 尿路バイオフィーム感染症の課題と展望. *日本化学療法学会雑誌*, 51(7): 426-430, 2003.
6. Iwamoto Y, Nishimura F, Soga Y, Takeuchi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y: Antimicrobial periodontal treatment decreases serum C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, but not adiponectin levels in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 74:1231-1236, 2003.
7. Matin K, Senpuku H, Hanada N, Ozawa H and Ejiri S. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) around immediate implants: A pilot study in Rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 18:211-217. 2003.
8. Nakao R, Hanada N, Asano T, Hara T, Salam MA, Matin K, Shimizu Y, Nakasone T, Horibata S, Aoba, Honda M, Amagasa T, Senpuku H. Assessment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leukocyte. *Immunology* 109:271-282. 2003.
9. Kawashima M, Hanada N, Hamada T, Tagami J and Senpuku H. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. *Oral Microbiol. Immunol.*2003 18:220-225.
10. Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H and Hanada N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology* 2003 49: 301-309. .
11. Harada S, Kamata Y, Ishii Y, Eda H, Kitamura R, Obayashi M, Ito S, Ban F, Kuranari J, Nakajima H, Kuze T, Hayashi M, Okabe N, Senpuku H, Miyasaka N, Nakamura Y, Kanegane H, and Yanagi K. Maintenance of serum immunoglobulin G antibodies to Epstein Barr Virus (EBV) nuclear antigen 2 in healthy individuals from different age groups in Japanese population with a high childhood incidence of asymptomatic primary EBV infection.

- Clinical Diagnostic Laboratory Immunology 2004. 11: 123-130.
12. Salam MA, Matsumoto N, Matin K, Tsuha Y, Nakao R, Hanada N, and Senpuku H, Establishment of animal model for initial adhesion of oral streptococci using recombinant NOD.B10.D2 mice. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology 2004. 11: 379-386.
 13. Kitasako Y, Senpuku H, Kawashima M, Foxton RM, Hanada N and Tagami J Growth-inhibitory effect of antibacterial self-etching primer on mutans Streptococci obtained from arrested caries lesions. J. Esthetic Restorative Dentistry 2004 in press.
 - 14.. Senpuku H, Tada A, Yamaga T, Hanada N, and Miyazaki H. Relationship between volatile sulfur compounds concentration and oral bacteria species detection in the elderly. Int. Dent. J. 2004 in press.
 15. Tsuha Y, Hanada N, Asano T, Abei T, Yamaguchi S, Salam MA, Nakao R, Takeuchi H, Kurosaki N and Senpuku H. Role of peptide antigen for in duction of inhibitory antibodies to *Streptococcus mutans* in human oral. Clin. Exp. Immunol. 2004 in press.
 16. 泉福英信、血液感染症を知り適切な対応を、アポロニア 21、3: 52 - 55. 2003.
 17. 泉福英信、宇宙時代は歯科の時代、日本歯科評論, 728: 22-24, 2003.
 18. 中尾龍馬、泉福英信、ウイルス感染と口腔の関わり：HIV/AIDS-1、日本歯科評論, 731: 22-24. 2003.
 19. 中尾龍馬、泉福英信、ウイルス感染と口腔の関わり：HIV/AIDS-2、日本歯科評論, 732: 22-24. 2003.
 20. 泉福英信、要介護高齢者の口腔微生物叢の改善のための歯科保健医療データバンクの構築、8020財団法人8020推進財団会誌、1: 85-87, 2004.
 21. 久山佳代, 太田泰人, Sisilia F. Fifita, 山本浩嗣, う蝕誘発性高シェークロース食および加齢によるラット肺組織の病理組織学的検討, 歯科基礎医学会雑誌, 45(3), 121-129, 2003

A. 宛名 : 分担研究者 泉福英信 殿

B. 指定課題名 : 平成 15 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 : 「口腔バイオフィルムとしての Nanobacteria の病
原的意義に関する研究」

D. 研究協力者

公文裕巳 (岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 教授)
狩山玲子 (岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 助手)
上原慎也 (岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学 医員)

E. 研究要旨

口腔バイオフィルムと全身疾患との関わりを追究することは、口腔保健が全身の健康状態に影響を及ぼしている状況を評価する上で重要な研究課題である。本研究課題は、新しく発見された Nanobacteria の病原的意義を解析することを目的としている。尿路結石と歯石に着目して Nanobacteria-like organism (NLO) の培養と形態観察を行ったところ、尿路結石からは高率に NLO が検出され分離培養も可能であったが、歯石からは NLO に相当する特徴的粒子は観察されなかった。NLO に関する研究は未だ初期段階であるが、腎結石をはじめとする異所性石灰化が新規微生物によるある種の持続感染症である可能性が示された。その定着や拡がりに歯石が関与しうる可能性、さらには NLO の微生物としての増殖様式などを含めて更なる解析を必要とする重要事項と考えられた。

F. 研究目的

口腔内の微生物感染症の新しい概念としてバイオフィルム感染症が提唱され、全身疾患との関わりが注目されている。通常、バイオフィルムは細菌が菌体外に産生する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) 中で微生物が

増殖コロニーを維持し、比較的穏やかな慢性持続感染症を呈するものである。Nanobacteria は新しく発見された微生物でありナノサイズ(直径 0.2 μ m 以下) と微小であることにくわえて、表層に EPS としてリン酸カルシウム (アパタイト) の外被を形成する特徴を有すると報告されている。バイオフィルムとして集簇的に増殖する傾向

を示し、生体内における病的石灰化としての尿路結石、歯石、動脈硬化などの形成に直接的に関与するとされる。今回、尿路結石と歯石における Nanobacteria の電子顕微鏡による観察とその分離培養を試みた。

G. 研究方法

岡山大学泌尿器科で採取された日本人の尿路結石 47 検体、パラグアイで採取された尿路結石 18 検体、岡山大学一般歯科診療室で採取された歯石 14 検体を対象とした。走査電子顕微鏡 (SEM) にて Nanobacteria-like organism (NLO) に特徴的な粒子を観察、判定した。フィンランド・グループの原法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8274, 1998) に従い、組織培養用 DMEM で分離培養した。また、財団法人高輝度光科学研究センター SPring-8 利用研究課題の採択を受けて、BL47XU の高分機能 X 線 CT 装置を用いての観察を試みた。

(倫理面への配慮)

日本人患者の結石に関しては、岡山大学付属病院で一般的に協力を依頼している検体の研究への使用に関する書面同意を得て本研究に使用した。パラグアイの結石に関しては、患者個人から同意をえる状況にないことに加えて、匿名性が確保しえることから特別な倫理面での配慮は必要ないものと判断した。

H. 研究結果

尿路結石の断面を SEM で詳細に観察した結果、フィンランド・グループの

報告したアパタイトを外皮とする極めて特徴的粒子としての NLO が同定可能であり、この NLO の形態は分離培養後における増殖粒子の形態と同一のものと考えられた。日本人の尿路結石とパラグアイ人の尿路結石での NLO の検出率は、それぞれ 61.7% (29/47)、66.7% (12/18) とほぼ同率であった。分離培養はそれぞれ 7 例と 3 例に可能であったが、その増殖性には検体ごとに差が見られた。検体とした尿路結石自体の成分分析において、リン酸カルシウム含有率は NLO 検出例では約 70%、分離培養例では約 78% と高率であったが、分析上でリン酸カルシウムを含有しないものからも検出・分離された。結石部位別の NLO 検出率では、膀胱結石 100% (11/11)、腎結石 65.5% (19/29)、尿管結石 42.91% (9/21) であった。一方、今回の歯石に関する SEM での解析では、尿路結石で認められる NLO に相当する特徴的粒子は観察されなかった。SPring-8 での解析では、NLO の大きさが分解能以下のサイズであったにもかかわらず、アパタイト層の構築様式の三次元的解析が可能であった。NLO は個々にアパタイトの外皮で被われ、それらが集簇的に融合、その集合体全体を包み込むように最外層のアパタイト層が構築されて成長することが明らかとなった。

I. 考察

尿路結石からは高率に NLO が検出され分離培養も可能であった。分離培養

した NLO はフィンランド・グループが作成した Nanobacteria に対するモノクローナル抗体で特異的に染色された。尿路結石の原因が新規微生物と関連する異所性石灰化である可能性が示唆された。一方、今回検討した歯石に関しては、大学病院という特殊性からいずれも比較的小さい歯石であったことから、その存在は確定しえなかった。今後、さらに検体を収集して検討する予定である。未だ研究の初期段階ということもあり、SEM 観察や分離培養という必ずしも効率のよくない検出法を現時点では採用している。今後、特異的な抗原検出法や遺伝子解析法を確立するとともに、異所性石灰化における Nanobacteria の病原的意義をさらに解析する必要があると考えられた。

J. 結論

腎結石をはじめとする異所性石灰化が新規微生物によるある種の持続感染症である可能性が示された。その定着や拡がりに歯石が関与しうる可能性、さらには NLO の微生物としての増殖様式などを含めて更なる解析を必要とする重要事項と考えられた。

K. 健康危険情報 なし

L. 研究発表

1. 発表論文

1. Ando, E., Monden, K., Mitsuhashi, R., Kariyama, R., Kumon, H. : Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus isolates from patients with urinary tract infection. Acta Medica Okayama, 2004 in press.

2. Kumon, H., Tomochika, K., Uesugi, K., Yagi N. : Analysis of molecular composition and imaging of *Nanobacteria*. SPring-8 User Experiment Report, No.11: 273, 2003.

II. 総説 (学会誌)

1. 門田晃一, 公文裕巳 : 難治性尿路感染症の課題と展望 尿路バイオフィーム感染症の課題と展望. 日本化学療法学会雑誌, 51(7): 426-430, 2003.

III. 刊行物 (単行本等)

1. 狩山玲子, 公文裕巳 (花田信弘監修) 第1部 バイオフィーム 第1章 生体のバイオフィーム ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学 (クインテッセンス出版, 東京) pp.2-26, 2003.
2. 狩山玲子, 益田美和, 光畑律子, 公文裕巳 : In vitro 実験プロトコール バイオフィーム実験講座 pp.3-19, 2003.

IV. 学会発表等

1. 門田晃一, 公文裕巳
シンポジウム 難治性尿路感染症の課題と展望「尿路 Biofilm 感染症の課題と展望」、第91回 日本泌尿器科学会総会: 徳島 2003, 4. 2-5
2. 狩山玲子, 益田美和, 光畑律子, 公文裕巳、サテライトシンポジウム バイオフィーム実験講座「In vitro 実験プロトコール」、第17回. Bacterial

- Adherence & Biofilm 学術集会: 岡山 2003, 7. 4-5
3. 瀬野祐子, 狩山玲子, 門田晃一, 光畑律子, 安東栄一, 村尾航, 上原慎也, 津川昌也, 公文裕巳、「尿路における *Enterococcus faecalis* の付着・定着・病原性に関する検討」、第 17 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会: 岡山 2003, 7. 4-5
 4. 三國谷雄, 加藤佳久, 渡部宏臣, 門田晃一, 狩山玲子, 公文裕巳「尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィルムに対するキノロン系薬と FOM の併用効果」、第 17 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会: 岡山 2003, 7. 4-5
 5. 瀬野祐子, 狩山玲子, 門田晃一, 光畑律子, 安東栄一, 村尾航, 上原慎也, 公文裕巳、「尿路における *Enterococcus faecalis* のバイオフィルム形成に関する基礎的および臨床的検討」、第 14 回 尿路感染症研究会: 東京 2003, 10. 25
 6. Kariyama, R., Mikuniya T., Kato, Y., Monden, K., Watabe, H., Kumon, H. 「Synergistic effect of fosfomycin and fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm」ASM Conference on Biofilms 2003 : Victoria, British Columbia, Canada 2003, 11. 1-6
 7. Kariyama, R., Seno Y., Mitsuata, R., Monden, K., Kumon, H. 「Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract」、ASM Conference on Biofilms 2003 : Victoria, British Columbia, Canada, 2003, 11. 1-6
 8. Kariyama, R., Seno, Y., Mitsuata, R., Monden, K., Kumon H. 「Clinical significance of *Enterococcus faecalis* in the urinary tract」1st Asian UTI/STD Forum : Fukuoka 2003, 11.22-23
 9. 安東栄一, 光畑律子, 瀬野祐子, 村尾航, 上原慎也, 狩山玲子, 門田晃一, 公文裕巳、「尿路感染症由来 MRSA の付着因子と Biofilm 形成能に関する検討」、第 51 回 日本化学療法学会西日本支部総会: 福岡 2003, 12.4-5
 10. 瀬野祐子, 光畑律子, 村尾航, 安東栄一, 上原慎也, 門田晃一, 狩山玲子, 公文裕巳、「岡山大学泌尿器科新病棟における耐性菌サーベイランス」、第 19 回日本環境感染学会総会: 横浜 2004, 2.20-21

Biofilm Formation among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
Isolates from Patients with Urinary Tract Infection

Eiichi Ando, Koichi Monden, Ritsuko Mitsuata,

Reiko Kariyama*, Hiromi Kumon

Department of Urology

Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

Okayama, 700-8558, Japan

Running title: Biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

* Corresponding author.

Reiko Kariyama

Department of Urology

Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

2-5-1, Shikata, Okayama, 700-8558, Japan

Phone: +81-86-223-7151 (ext.7288)

Fax: +81-86-231-3986

E-mail: kariyama@md.okayama-u.ac.jp (R. Kariyama)

Staphylococci have been confirmed to form biofilms on various biomaterials. The purpose of this study was to investigate biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from patients with urinary tract infection (UTI) and to assess the relationship between biofilm-forming capacities and virulence determinants/clinical background. Over a 12-year period from 1990 through 2001, a total of 109 MRSA isolates were collected from patients (one isolate per patient) with UTI at the urology ward of Okayama University Hospital. We used the *in vitro* microtiter plate assay to quantify biofilm formation. We then investigated the presence of several virulence determinants by polymerase chain reaction assay and found eight determinants (*tst*, *sec*, *hla*, *hly*, *fliC*, *clfA*, *icaA*, and *agrII*) to be predominant among these isolates. Enhanced biofilm formation was confirmed in *hla*-, *hly*-, and *fliC*-positive MRSA isolates, both individually and in combination. Upon review of the associated medical records, we concluded that the biofilm-forming capacities of MRSA isolates from catheter-related cases were significantly greater than those from catheter-unrelated cases. The percentage of *hla*-, *hly*-, and *fliC*-positive isolates was higher among MRSA isolates from catheter-related cases than those from catheter-unrelated cases. Our studies suggest that MRSA colonization and infection of the urinary tract may be promoted by *hla*, *hly*, and *fliC* gene products.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, urinary tract infection, biofilm formation

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been identified as a major pathogen in nosocomial infections [1, 2]. The percentage of MRSA among nosocomial *S. aureus* isolates in Japan is estimated to be 50% to 70% [3]. The incidence of urinary tract infection (UTI) caused by MRSA is increasing because patients are more frequently fitted with various urinary stents and catheters as endourology progresses technologically [4].

Staphylococci, including *S. aureus*, are known to form biofilms on various biomaterials [5]. These organisms can persist in clinical settings and gain increased resistance to antimicrobial agents through biofilm formation that appears to be a bacterial survival strategy [6, 7]. Therefore, biofilms formed by MRSA have become resistant to most available antimicrobial agents. The polysaccharide intracellular adhesin (PIA), encoded by *ica* genes, has been shown to be required for biofilm formation by staphylococci [5]. More recently, α -toxin (Hla) has also been shown to play an integral role in biofilm formation [8]. The pathogenesis of *S. aureus* is attributed to the combined effects of extracellular factors and toxins, together with invasive properties such as adherence, biofilm formation, and resistance to phagocytosis.

S. aureus secretes a plethora of virulence factors such as toxins and enzymes [9], some of which cause particular diseases. For example, toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) causes toxic shock syndrome (TSS) and staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC, *etc.*) cause food poisoning. TSST-1 and SEs are known as superantigens. *S. aureus* also produces a number of cytotoxic molecules that include four hemolysins (α - [Hla], β - [Hlb], δ - [Hld], and γ - [Hlg] toxins). Production of these virulence factors in *S. aureus* is carefully controlled in response to cell density (quorum sensing), energy availability, and environmental signals by accessory gene regulators including Agr, Sar, Sae, and others [10]. These global regulators also control surface proteins (adhesins), such as two

fibronectin-binding proteins A and B (FnBPA and FnBPB), two fibrinogen-binding proteins known as clumping factors A and B (ClfA and ClfB), and a collagen-binding protein (Cna), which are responsible for the adherence, colonization, and biofilm formation of MRSA isolates [5, 7, 10, 11]. However, no clear mechanism has been elucidated for biofilm formation and pathogenicity of *S. aureus* infections of the urinary tract.

In the present study, we investigated the relationship between biofilm-forming capacities and virulence determinants/clinical background of 109 MRSA isolates collected from patients with UTI over a 12-year period from 1990 to 2001 at the Department of Urology, Okayama University Hospital. We analyzed the presence of genes encoding superantigens (*tst*, *sec*, *sea*, *seb*), hemolysins (*hla*, *hly*), surface proteins (*fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *cna*), PIA (*icaA*), and global regulators (*agrI*, *agrII*, *agrIII*, and *agrIV* subgroup) in the MRSA isolates and retrospectively reviewed the associated medical records.

Materials and Methods

Bacterial isolates. The bacterial isolates used in this study were MRSA isolated from patients with UTI at the Department of Urology, Okayama University Hospital, over a 12-year period from 1990 through 2001. A total of 109 isolates that grew to $>10^4$ CFU/ml in urinary culture were selected for this study. All 109 patients (one isolate per patient) had documented pyuria (WBC >5 /hpf). MRSA was defined as an *S. aureus* isolate possessing the *mecA* gene [4].

Biofilm formation assay. MRSA isolates were grown overnight at 37°C in brain heart infusion broth supplemented with 2% glucose and 2% sucrose [12]. The culture was diluted 1:100 in medium, and 150 μ l of this cell suspension was used to inoculate sterile

flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plates (Corning Inc., Corning, NY, USA). After 48 h at 37°C without shaking, wells were gently washed three times with 300 µl of distilled water, dried in an inverted position, and stained with 300 µl of 2% crystal violet solution in water for 45 min. After staining, plates were washed three times with distilled water. Quantitative analysis of biofilm production was performed by adding 200 µl of ethanol-acetic acid (95:5, vol/vol) to destain the wells. One hundred microliters from each well was transferred to a new microtiter plate, and the level (optical density; OD) of crystal violet present in the destaining solution was measured at 570 nm using a microtiter plate reader (Seikagaku Co., Tokyo, Japan). Each assay was performed in triplicate. As a control, uninoculated medium was used to determine background OD. The mean OD₅₇₀ value from the control wells was subtracted from the mean OD₅₇₀ value of tested wells.

Polymerase chain reaction (PCR) assay. PCR assays were performed to detect various genes in the MRSA isolates. The primers and PCR conditions used in this study are summarized in Table 1. Total cellular DNA was prepared as follows: 0.5 ml of MRSA culture, grown overnight in brain heart infusion broth (Nissui, Tokyo, Japan), was centrifuged, and the pellet was resuspended in 50 µl of InstaGene (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). After the suspension was heated for 10 min at 100°C, 2.5 µl (or 5 µl for detection of *agrI*, *agrII*, *agrIII*, and *agrIV*) of the supernatant was mixed with 22.5 µl (or 20 µl for detection of *agrI*, *agrII*, *agrIII*, and *agrIV*) of premade reaction mixture to start the reaction. The primer pairs (2.5 pmol) for *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *hla*, *hly*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *cna*, and *icaA*, and those (5 pmol) for *agrI*, *agrII*, *agrIII*, and *agrIV* were added to the respective reaction mixtures. The 25-µl reaction volume contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, MgCl₂ (concentrations shown in Table 1), 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), and 0.625 U of *Taq* DNA polymerase (Takara Shuzo, Shiga, Japan). DNA amplification was carried out using the