

微生物叢の検討を行うこととした。担癌患者の手術後は免疫力の低下により感染に対する抵抗力が低下し、感染の危険性は高まる。昨年度と同様に今回、前立腺癌患者の手術前後における歯垢中の細菌を調査し、手術侵襲や合併症の影響による口腔内細菌の変化につき検討した。

#### F. 研究計画:

(対象・方法) 2002年7月から2004年12月の間に岡山大学医学部付属病院泌尿器科に入院した前立腺癌患者のうち、根治的前立腺全摘術を受けた患者18人を対象とし、手術前後の歯垢サンプルを採取し細菌を同定した。歯垢サンプルは、手術前日および手術後3日目の朝食前または夕食前に、対象者の左側上顎臼歯部5・6・7番の頬側歯茎部の歯垢をシードスワブ1号の滅菌キャップ付綿棒で5往復擦過し、さらに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方法で採取した。歯垢サンプルは(株)ビー・エム・エルへ郵送、培養し、カンジダの定量を行った。抗菌薬は、SBT/ABPC(ユナシンS:ファイザー製薬)3.0g/日を3日間投与した。

#### G. 結果:

患者背景を表1・2に示す。年齢は50から74歳で平均年齢は65.5歳であった。術前合併症を認めなかった患者は9例、認めた患者は9例で高血圧6例、糖尿病4例などであった。手術法別では開腹手術が15例、腹腔鏡手術が3例であった。術後の創感染は3例に認めた。

手術前後のカンジダの培養結果を表3-1・2に示す。術後のカンジダ陽性率の増加(47%から57%に増加)を認めた。カンジダ量が上昇した症例を5例認めた。術前合併症との関係を検討してみると(表4)、術前合併症のある7例中4例(57%)が術前陽性であった。合併症の内訳は、5例全例に高血圧を認めた。糖尿病は2例に認めた。合併症のない症例7例には術前陽性例は1名であった。そのうち4例(57%)は術後カンジダ量が上

昇した。手術法や手術時間との間に明らかな関連性はなかった(表5・6)

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ける検出率の比較検討を行うと(表1、表2)、統計学的に有意な差が認められる菌は確認できなかった。また対照として74才の自立高齢者の歯垢中菌の検出率と比較検討を行うと、これも統計学的に有意な差が認められる菌は確認できなかった。

#### H. 考察:

合併症を有する患者の術前のカンジダ陽性率は、術前に合併症を有さない患者と比べて高かった。しかし、術後のカンジダ陽性率は合併症を有さない患者において高かった。一方、合併症を有する患者は術前にすでにカンジダがみられたため術後のカンジダの上昇が強く認められなかった。これらのことから、合併症を有さない患者において、手術侵襲が加わって免疫力が低下した結果、口腔内細菌叢に変化が生じた可能性が考えられた。また、術後のカンジダ陽性率の上昇には、抗菌薬投与による菌交代の影響も考慮する必要があると思われる。合併症を有する患者や術後の患者は、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思われた。

74才の自立高齢者との比較では、好気性および嫌気性微生物における統計学的に有意な差が認められなかったが、まだ前立腺癌患者は18人と少なく今後人数を増やし、全身疾患を有する高齢者と健康な自立高齢者との口腔バイオフィルム微生物を比較検討していく必要がある。

#### I. 発表論文

1. K. MATIN, H. SENPUKU, N. HANADA, H. Ozawa and S. Ejiri. 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.

2. R. NAKAO, N. HANADA, T. ASANO, T. HARA, Md A. SALAM, K. MATIN, Y. SHIMAZU, T. NAKASONE, S. HORIBATA, T. AOBA, M. HONDA, T. AMAGASA, H. SENPUKU. Assessment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leukocyte. *Immunology* 109:271-282. 2003.
3. 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 18:220-225.
4. 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 49: 301-309. .
5. S. HARADA, Y. KAMATA, Y. ISHII, H. EDA, R. KITAMURA, M. OBAYASHI, S. ITO, F. BAN, J. KURANARI, H. NAKAJIMA, T. KUZE, M. YAYASHI, N. OKABE, H. SENPUKU, N. MIYASAKA, Y. NAKAMURA, H. KANEGANE, and K. YANAGI. 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.
6. Md A. SALAM, N. MATSUMOTO, K. MATIN, Y. TSUHA, R. NAKAO, N. HANADA, and H. SENPUKU, Establishment of animal model for initial adhesion of oral streptococci using recombinant NOD.*B10.D2* mice. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 2004. 11: 379-386.
7. Y. KITASAKO, H. SENPUKU, M. KAWASHIMA, R. M. FOXTON, N. HANADA and J. TAGAMI, Growth-inhibitory effect of antibacterial self-etching primer on mutans Streptococci obtained from arrested caries lesions. *J. Esthetic Restorative Dentistry* 2004 in press.
8. H. SENPUKU, A. TADA, T. YAMAGA, N. HANADA, amd H. MIYAZAKI. Relationship between volatile sulfur compounds concentration and oral bacteria species detection in the elderly. *Int. Dent. J.* 2004 in press.
9. Y. TSUHA, N. HANADA, T. ASANO, T. ABEI, S. YAMAGUCHI, MA. SALAM, R. NAKAO, H. TAKEUCHI, N. KUROSAKI and H. SENPUKU. Role of peptide antigen for in duction of inhibitory antibodies to Streptococcus mutans in human oral. *Clin. Exp. Immunol.* 2004 in press.
10. 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.
11. 泉福英信、宇宙時代は歯科の時代、日本歯科評論, 728: 22-24, 2003.
12. 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.
13. 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.
14. 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ベースの構築、8020財団法人8020推進財団会誌、1: 85-87, 2004.

期間	2002年7月～2004年1月
症例数	18例
年齢	66.5±6.9歳
術前合併症	なし 9例 あり 9例 (高血圧6例・糖尿病4例など)
手術法・手術時間	175-380分 (平均270±57.9分) 開腹 15例 175～315分 (平均250分) 腹腔鏡 3例 355～380分 (平均372分)
術後合併症	創感染 3例 なし 15例

表 1. 患者背景 1

No.	名前	術前合併症	手術法	手術時間 (分)	麻酔時間 (分)	術後合併症
1.	N・Y	なし	開腹	205	265	なし
2.	M・M	なし	開腹	270	350	なし
3.	T・Y	なし	開腹	250	325	なし
4.	N・T	高血圧・狭心症	開腹	300	345	なし
5.	Y・M	なし	腹腔鏡	355	390	創感染
6.	H・Y	糖尿病・リウマチ	開腹	255	320	なし
7.	Y・Z	高血圧・糖尿病	腹腔鏡	380	455	なし
8.	N・T	高血圧・肺気腫	開腹	175	200	なし
9.	M・S	なし	腹腔鏡	380	440	なし
10.	G・T	なし	開腹	225	265	なし

表 2. 患者背景 2

N=14

	陽性	陰性
術前	6例(43%)	8例(57%)
術後	8例(57%)	6例(43%)

表 3-1 手術前後における *Candida* の検出 (術後 4名検体採取なし)

N=14

上昇	陰性→陰性	陽性で大きな変化なし	下降
5例 (36%)	6例 (43%)	0例 (0%)	3例 (21%)

表 3-2 手術前後における *Candida* 検出の内訳 (術後 4名検体採取なし)

N=14

合併症あり (N=7)	合併症なし (N=7)
4例 (57%)	1例 (14%)

表 4-1 合併症の有無による手術前 *Candida* 陽性率

N=14

	合併症あり (N=7)	合併症なし (N=7)
上昇	1例 (14%)	4例 (57%)
陰性→陰性	3例 (43%)	3例 (43%)
陽性で大きな変化なし	0例 (0%)	0例 (0%)
下降	3例 (43%)	0例 (0%)

表 4-2 合併症の有無による手術前後の *Candida* 陽性率

N=14

	開腹 (N=11)	腹腔鏡 (N=3)
上昇	4例 (36%)	1例 (33%)
陰性→陰性	5例 (45%)	1例 (33%)
陽性で大きな変化なし	0例 (0%)	0例 (0%)
下降	2例 (18%)	1例 (33%)

表 5 手術法別の手術前後の *Candida* 陽性率

N=14

	上昇	陰性→陰性	陽性で大きな変化なし	下降
症例数 (%)	5例 (36%)	6例 (43%)	0例 (0%)	3例 (21%)
平均手術時間(分)	267	264	0	308

表 6 手術前後の *Candida* 検出の変化と手術時間

表 7 前立腺癌患者の歯垢中微生物の検討 (好気性菌)

Bacteria and fungi	前立腺癌 n = 14		対照 (74才) n = 464
	術前	術後	
<i>α-streptococcus spp.</i>	11 (79%)	8 (57%)	-
<i>γ-streptococcus spp.</i>	4 (29%)	1 (7%)	-
<i>Neisseria spp.</i>	5 (36%)	4 (29%)	-
<i>Candida albicans</i>	6 (43%)	8 (57%)	135 (30%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (14%)	3 (21%)	28 (6%)
<i>Flavobacterium spp.</i>	2 (14%)	1 (7%)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (7%)	2 (14%)	32 (7%)
<i>Escherichia coli</i>	2 (14%)	0 (0%)	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (7%)	1 (7%)	-
<i>Staphylococcus spp.</i>	0 (0%)	2 (14%)	8 (2%)
<i>Citrobacter spp.</i>	0 (0%)	1 (7%)	-
<i>Serratia marcescens</i>	1 (7%)	1 (7%)	5 (1%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (7%)	1 (7%)	4 (<1%)
β-haemolytic streptococcus (type B)	0 (0%)	0 (0%)	2 (<1%)
<i>Acinetobacter spp.</i>	0 (0%)	1 (7%)	41 (9%)
<i>Candida parapsilosis</i>	0 (0%)	0 (0%)	23 (5%)
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	0 (0%)	0 (0%)	2 (<1%)

表 8 前立腺癌患者の歯垢中微生物の検討 (嫌気性菌)

Bacteria	前立腺癌 n = 10		対照 (74才) n = 67
	術前	術後	
<i>Capnocytophaga spp.</i>	8 (80%)	5 (50%)	67 (100%)
<i>Veillonella spp.</i>	9 (90%)	100 (100%)	67 (100%)
<i>Actinomyces spp.</i>	3 (30%)	0 (0%)	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5 (50%)	3 (30%)	36 (54%)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	3 (30%)	1 (10%)	18 (27%)
<i>Prevotella denticola</i>	2 (20%)	1 (10%)	-
<i>Fusobacterium varium</i>	1 (10%)	2 (20%)	-
<i>Prevotella spp.</i>	1 (10%)	0 (0%)	-
<i>Fusobacterium spp.</i>	1 (10%)	0 (0%)	-
<i>Bacteroides spp.</i>	1 (10%)	2 (20%)	-

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」

D. 研究協力者

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)

E. 研究目的

口腔局所の感染症として発症する歯周炎は重症化することで、全身の健康に影響を及ぼすことが示唆されている。しかしながら歯周炎が生体にとって実際問題どの程度の炎症反応を惹起するかについては明らかでない。この問題を明らかにすることは、前述の歯周炎と全身の健康との関連性を、説得力を持って語るうえで、あるいは口腔保健の重要性を社会的に広く認知させるうえで、ひいては今後の厚生労働行政を展開するうえで必須の課題である。

本分担は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することを目的とした。

F. 研究方法

(1) 方法

虚血性心疾患に対するハイリスクグループ (2 型糖尿病、耐糖能異常、高脂血症、高血圧等の定義のうち少なくとも 1 つを

有する全身疾患患者) で重度の歯周炎を発症した患者 15 名に対して、週 1 回 4 週連続して局所抗生剤投与を主体とした歯周治療を施し、治療前後で高感度 C-反応性蛋白 (CRP) 値に変動があるかどうかを検討した。同時に治療前後の歯周ポケット内細菌数、血中腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ) 濃度を測定した。

(2) (倫理面への配慮)

プロトコール実施に先立って被験者に①研究内容の趣旨を十分に説明するとともに、②本プロトコールへの同意が得られなくても通常の治療内容に一切違いはない旨を確約した。ただし、本プロトコールは通常の歯周治療の一環として行うものであり、新規の治療法等を試みるものではないことからプロトコールそのものに伴う危険性は通常の歯周治療と同程度であると判断した。

G. 研究結果

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 ( $p < 0.0015$ , Wilcoxon's rank test) するとともに高感度 CRP 値も有意に低下した ( $p < 0.01$ ,

Wilcoxon's rank test)。血中 TNF- $\alpha$ 濃度も微量ではあるものの有意に低下した ( $p < 0.03$ , Wilcoxon's rank test)。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 ( $p < 0.0007$ ,  $p < 0.0006$ , Wilcoxon's rank test)。

## H. 考察

歯周治療に伴って高感度 CRP 値は有意に低下した。近年、従来健常域と定義づけられてきた CRP の範囲内であっても高めの値を示す者ほど将来的に虚血性心疾患を発症するリスクが亢進することが示されたことから、軽微な慢性炎症が虚血性心疾患の発症や進行に影響を与えている可能性が指摘され注目されている。実際問題、動脈硬化巣には単球をはじめ T 細胞や B 細胞等の炎症性細胞が多数浸潤していることから炎症反応が本疾患の進行に重要な役割を果たすことが示唆されている。歯周病によって上昇する CRP も前述の意味からすると従来健常域とされてきた範囲内である。Ridker らは、全身的に明らかな炎症所見のない健常者を対象に高感度測定法によって測定した CRP の値に応じて被験者群を 4 群に群別し、各々の群における心筋梗塞に対する相対危険度を算出した (Ridker PM *et al.*, *New Engl J Med*, 1997)。それによると、最も CRP 値の低い群に比べ、CRP が上昇するにつれ心筋梗塞に対する高 CRP 群の相対危険度は各々 2.0、2.4 そして 4 倍と上昇することが示された。このデータを今回の分担者らが得た歯周治療に伴って CRP 値が低下するとしたデータに照らし合わせ考察すると、歯周治療によって多くの患者で心筋梗塞に対するリスクを 50~60% 程度低下させることが可能であることに

なる。すなわち、歯周炎によって惹起される炎症反応は、CRP 値に置き換えて言えば従来の健常域内ではあるものの高めの値であり、虚血性心疾患に対するリスクを亢進させるに十分なものであると考えられた。この意味からすると歯周炎は生体にとって軽微な慢性炎症、すなわち *sub-clinical range* の慢性炎症と捉えることができると言えよう。

一方、CRP は炎症性サイトカイン interleukin-6 (IL-6) 刺激によって肝細胞から産生される急性期蛋白である。従って、歯周炎によって CRP レベルが上昇し、治療に伴って低下するという事実は、少なくとも重度の歯周炎患者では CRP 産生を惹起するに十分な IL-6 刺激が肝細胞に作用していることを意味する。この事実から考察すると IL-6 のソースは肝臓におけるマクロファージであるクッパー細胞や脂肪細胞であるかもしれない。実際、内臓脂肪が蓄積した肥満患者でも CRP 値が高めの値を示すこと、その際の IL-6 の主要な供給源は脂肪細胞であることが示されている。肝臓は生体に侵入した毒素や異物を中和する重要な臓器である。従って、重症の歯周炎患者では血中に侵入した歯周病菌由来 lipopolysaccharide (LPS) や他の抗原が肝臓で過剰される際、その濃度が一時的に上昇し、それに伴ってクッパー細胞や脂肪細胞からの IL-6 産生性が亢進するものと考察される。

高感度 CRP を上昇させる炎症反応は 2 型糖尿病患者におけるインスリン抵抗性とも密接に関連する。これはやはり脂肪細胞が産生する TNF- $\alpha$  が脂肪細胞自身の糖の取り込みを阻害すること、また肝細胞からの糖の新生を促し取り込みを阻害することに起因するとされている。分担者らは歯周治療に伴って 2 型糖尿病患者の血糖コントロールがインスリン抵抗性

の改善を介して好転することを報告した (Iwamoto Y *et al.*, *J Periodontol*, 2001)。また、その過程で血中 TNF- $\alpha$ 濃度が低下することも報告した。しかしながら歯周治療に伴って低下する血中 TNF- $\alpha$ 濃度は微量であり、その差が末梢のインスリン抵抗性の改善に直結するかどうかという問題には疑問が残る。本研究でも歯周治療に伴ってインスリン抵抗性惹起分子である TNF- $\alpha$ の血中濃度は微量ではあるものの有意に低下した。このことから、TNF- $\alpha$ の供給源も歯周局所の炎症巣ではなくやはりクッパー細胞や脂肪細胞にあるのかもしれない。インスリン感受性臓器の主なものは肝臓や脂肪組織であることから、そう考えると歯周炎症がインスリン抵抗性に関する機序も考察しやすい。

以上のことから、歯周炎は生体にとって虚血性心疾患のリスクを亢進するに十分な慢性炎症であり、また2型糖尿病のインスリン抵抗性に影響を与えるに匹敵する炎症反応を惹起すると考えることができた。

#### I. 結論

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。

#### J. 健康危険情報

該当なし

#### K. 研究発表

1. 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.

#### L. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



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」

D. 研究協力者

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)

E. 目的: 嚥下性肺炎は、無歯顎者に比べ有歯顎者で多いとの報告から、口腔内環境が本疾患発症の一つの誘因になっていると考えられている。それ故口腔内環境に影響を与える因子である口腔微生物に起因する日和見感染症の予防対策が急務である。特にカンジダは嚥下性肺炎の原因菌である嫌気性菌と共凝集しやすいため、その病原性を発揮する環境についての研究が必要である。また口腔内環境および病態に深く関わっている唾液の評価も併せて行うことが重要と考えられる。本研究では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 の測定を行い、若干の興味ある知見を得たので報告する。

F 方法:

① 口腔カンジダ属の臨床病理学および細胞学的検索

臨床症状を随伴し、さらに剥離細胞診にて口腔カンジダ症と診断された高齢者(65 歳以上,平均 71.5 歳)70 症例のカン

ジダ属について、臨床病理学および画像解析プログラム(Mac SCOPE ver.2.55)にて計量学的観察を施した。対照として臈カンジダ症 20 症例とした。

② 高齢者唾液中カンジダ属の同定検査および EGF、s-IgA 濃度の測定

インフォームドコンセントを行った要介護高齢者 27 名および健康成人 20 名に対し、舌擦過物を真菌分離用培地に塗抹し、37℃にて培養を行った。形成されたコロニーはカンジダチェックにて属の鑑別を行った。さらに安静時の唾液採取を行い、試料は緩衝能検査 (Dentobuff STRIP: Orion, Finland) および ELISA 法 (上皮細胞増殖因子(EGF)、s-IgA の測定) に供した。

G 結果・考察:

① 口腔カンジダ属の臨床病理学および細胞学的検索結果

口腔カンジダ症と診断された高齢者 70 名の内訳は、部位が舌 27 名、歯肉 15 名、頬粘膜 13 名、口蓋 11 名、口唇 4 名であり、主訴が白斑、剥離びらん、刺激痛、

発赤および舌乳頭の萎縮の順であった。口腔粘膜で検出されたカンジダ属は、分芽細胞細胞、分芽孢子、仮性菌糸および菌糸のすべての形態がみられる二形性真菌であり、また口腔のカンジダ菌糸は、膿のそれと比較して長さ 1.1 倍、幅 2.3 倍と大きく、隔壁が不明瞭であった。その形態変換および成長を誘導する因子として口腔内温度、pH、炭素源および窒素源および唾液中物質が関係するものと考えられた。

## ② 要介護高齢者唾液中カンジダ属の同定検査結果

要介護高齢者の舌擦過物培養同定検査の結果、健康成人の 5%(*Candida albicans*)、要介護高齢者の 78%(*Candida albicans* 86%, *Candida tropicalis* 14%) にコロニー形成が観察された。*Candida tropicalis* は、抗真菌剤に耐性を有するため特に高齢者の口腔内で増殖している菌種であることが報告されており、本調査でもそれを示唆する結果が得られた。

## ③ 要介護高齢者唾液緩衝能および唾液中 EGF, s-IgA について

要介護高齢者平均 EGF 濃度(1.70 ± 1.02ng/ml)は健康成人のそれ(4.29 ± 3.38ng/ml)と比較して有意に低く、本結果から高齢者における唾液中の細胞分化増殖促進能力の低下が推察された。唾液緩衝能については、低い(11.1%), やや低い(29.6%), 中等度(11.1%), やや高い(33.3%), 高い(14.8%)という分布であったが、唾液中 s-IgA との関連について検討した結果、緩衝能にほぼ比例して s-IgA 濃度が高かった。分泌型 IgA は抗原刺激されたリンパ球が唾液腺組織内で IgA を産生し、さ

らに唾液腺導管上皮細胞で s-IgA となり、唾液中に分泌され、粘膜面での微生物感染を予防する重要な因子として機能している。加えてカンジダ培養結果も併せて比較すると、緩衝能が低いグループではカンジダのコロニー形成も多く認められた。

本研究をまとめると、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および s-IgA 定量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、これら唾液因子のカンジダ病原性を発揮する環境を構成する一要因としての可能性が示唆された。

## H. 健康危険情報:

該当なし

## I. 研究発表:

- (1) 久山佳代, Sisilia F Fifita, 松本敬, 山本浩嗣: 口腔剥離細胞診でみられたカンジダ症の検討, 日本臨床細胞学会総会, 2002. 5. 30, 大阪
- (2) 水野恭子, 後藤田宏也, 竹内武夫, 吉尾雅子, 斉藤美芽子, 井田博久, 福島和雄, 小林清吾: 唾液中のミュータンスレンサ球菌レベルとう蝕有病との相関 改良型 MSB 培地の応用, 歯科基礎医学会学術大会, 2002. 10. 5, 東京
- (3) 後藤田宏也, 水野恭子, 田口千恵子, 鈴木瑠美, 有川量崇, 竹内武男, 篠崎紀子, 井田博久, 福島和雄, 小林

清吾；歯垢中の *S. sobrinus* の存否, *S. mutans* のレベル及びイオン希釈法による唾液の緩衝能とう蝕リスクとの関連性, 第51回日本口腔衛生学会総会, 2002. 9. 13, 大阪

- (4) 久山佳代, 太田泰人, Sisilia F. Fifita, 山本浩嗣, う蝕誘発性高シユ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, 2003. 9, 盛岡
- (5) 久山佳代, 妻鹿純一, 落合智子, 小林清吾, 山本浩嗣, 泉福英信他：口腔内環境と嚥下性肺炎の病体変化機構の解明, 平成13年度私立大学学術研究高度化推進事業 学術フロンティア推進事業 研究成果中間報告会, 2004. 2. 28, 千葉
- (6) 遠藤弘康, 岡田裕之, 久山佳代, 宇都宮忠彦, 松本敬, 山本浩嗣：口腔カンジタ症の特徴的な臨床所見と細胞像の研究, 日本臨床細胞学会総会, 2004. 7, 東京 (演題登録済)
- (7) 久山佳代, 太田泰人, Sisilia F. Fifita, 山本浩嗣, う蝕誘発性高シユ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

J. 知的財産権の出願・登録状況:

該当なし

Relationship between volatile sulfur compounds  
concentration and oral bacteria species detection in the  
elderly

**Hidenobu Senpuku\* DDS, PhD**

Laboratory Head, 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

*Aim.* The aim of this study was to evaluate the relationship between oral bacteria species detection and volatile sulfide compounds (VSC) concentration in the elderly.

*Design.* Cross-sectional microbiological and clinical VSC examination of elderly.

*Participants.* Sixty-seven elderly, aged 75, participated in this study. They were functionally independent and dentate.

*Methods.* VSC ( $\text{H}_2\text{S}$  and  $\text{CH}_3\text{SH}$ ) concentrations in mouth air of subjects were measured using portable gas chromatography. Oral bacteria samples were taken from dental plaque and Identification of bacteria species was accomplished using standard methods.

*Results.* Less than 20% of subjects showed more than 10ng/10ml of  $\text{H}_2\text{S}$  (severe odor level). The detection rate of *P. melaninogenica* was significantly higher in elderly with more than 10ng/10ml ( $p=0.043$ ).

*Fusobacterium* had a tendency to be found in elderly with more than 10ng/10ml, but significant relation was not found.

*Conclusions.* The results suggest that *Fusobacterium* and *P. melaninogenica* may be involved in the production of  $\text{H}_2\text{S}$  in the oral cavity of elderly.

## Introduction

In recent years, the concerns about oral malodor have been increasing. Oral malodor includes stench resulting generally from periodontal disease (1-5), rarely from diabetic mellitus (6), and heavy caries (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 an unavoidable problem for performing oral care smoothly.

Volatile sulfide compounds (VSC) have been considered to be correlated with oral malodor and several VSCs have been used as the indicator of oral malodor (4, 11-14). There have been several reports on the VSC production ability of bacteria species (14-20). But there has been no report on the relation between oral bacteria species detection and oral VSC concentration in mouth air. It is necessary as an indicator for oral care of elderly to elucidate the oral bacteria species which are concerned with VSC concentrations in an epidemiological study.

Dental plaque is known to be a biofilm, reservoir of bacteria species

from which planktonic bacteria disperse and attach to other organ and tissue (21). We have suggested that dental plaque, saliva, tonsil and pharynx had similar biofilm bacteria, and these organisms were released from tooth surfaces into saliva and then colonize on oral cavity surface (22,23). We hypothesized that bacteria species producing VSC in periodontal pocket and dorsum of the tongue are originated in dental biofilm. Our major concern is association of bacteria species in dental biofilm with VSCs concentrations in the oral cavity.

In the present study, we analyzed the relationship between VSC concentration and bacteria species detected 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.

### VSC analysis of mouth air

H<sub>2</sub>S and CH<sub>3</sub>SH concentration were used as the indicator of oral malodor. The VSC concentrations in mouth air of subjects were measured as follows.



1. Prior to each analysis, following a deep breath, the subjects were instructed to keep their mouth closed and breathe through their nose quietly for 30 sec.
2. A 1 mL disposable syringe was then inserted into the center of the oral cavity through the lips and teeth, while the mouth remained closed.
3. Thereafter, after aspirating 1 mL of oral air with the disposable syringe, 0.5 mL of oral air was injected into the GC-SCS for portable gas chromatography (Takasago Electric Co., Ltd, Japan, 24).
4. To avoid inter-operator variation, all gas chromatography measurements were performed by a single trained individual.

#### Identification of oral bacteria

Samples were taken from dental plaque on upper molar teeth or upper molar portions of dentures using sterile cotton stick. 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% CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub> 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 methods were used to confirm identification of the bacteria on the detection plates: *Staphylococcus aureus* [Methicillin sensitive (MSSA) and resistant (MRSA)] by using 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 using the gas pack system. Representative microbial colonies from each plate were gram stained and isolated by RapID ANA II system. Each colony was suspended in 0.6% KCl, 0.05% CaCl<sub>2</sub>, 0.16mM NaOH. The suspension was inoculated in 10 separate detection medium (1: 0.4% Urea, 2: 0.1% p-Nitrophenyl- $\beta$ , D-disaccharide, 3: 0.1% p-Nitrophenyl- $\alpha$ , L-arabinoside, 4: 0.1% p-Nitrophenyl- $\beta$ , D-galactoside, 5: 0.1% p-Nitrophenyl- $\alpha$ , D-glucoside, 6: 0.08% p-Nitrophenyl- $\beta$ , D-glucoside, 7: 0.08% p-Nitrophenyl- $\alpha$ , D-galactoside, 8: 0.08% p-Nitrophenyl- $\alpha$ , L-fucoside, 9: 0.1% p-Nitrophenyl-n-acetyl- $\beta$ , D-glucosaminide, 10: 0.1% p-Nitrophenyl-phosphate) and incubated in an

atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub> at 37°C for 4-6 hours (primary test). In a 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 the series of our oral malodor measurement, several examiner have smelled severe odor at a concentration of about 10ng/10ml of H<sub>2</sub>S and about 0.5 ng/10ml of CH<sub>3</sub>SH. Therefore, concentration of H<sub>2</sub>S and CH<sub>3</sub>SH were classified into two groups ( $\leq 10\text{ng}/10\text{ml}$ ,  $10\text{ng}/10\text{ml} <$  for H<sub>2</sub>S and  $\leq 0.5\text{ng}/10\text{ml}$ ,  $0.5\text{ng}/10\text{ml} <$  for CH<sub>3</sub>SH). 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.

### Results

#### 1. The distribution of VSC concentration

The distribution of H<sub>2</sub>S and CH<sub>3</sub>SH concentration is shown in Table 1. Less than 20% of subjects showed severe odor level in H<sub>2</sub>S concentration (more than 10ng/10ml of H<sub>2</sub>S). A greater percentage of women than men had 10ng/10ml, but no significantly difference was

found between genders. With regard to CH<sub>3</sub>SH, about half the subjects had a recognition level of CH<sub>3</sub>SH concentration (more than 0.5ng/10ml of CH<sub>3</sub>SH). The concentration of CH<sub>3</sub>SH of women was significantly higher than that for men.

## 2. The detection of bacterial species

The detection rate of major microorganisms from dental plaque, as determined using the manufacture's instructions, is shown in Table 2. Of the aerobic microorganisms,  $\alpha$ -*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%.

Regarding anaerobic bacteria species, only *Capnocytophaga* sp. were detected in all subjects. *P. melaninogenica* was isolated from about half of subjects (53.7%). *Fusobacterium* species and *P. corporis* were isolated from about quarter of subjects. There was not significant differentiation in the detection rates of bacteria species between both sexes (data not shown).

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

We analyzed the relationship between VSC concentration and detection of each bacteria species by using Mantel-Haenszel test. Subjects with more than 10ng/10ml of H<sub>2</sub>S showed a significantly higher detection rate of and *P. melaninogenica* than subjects with less than 10ng/10ml