

感染症対策はどこまでやればよいか？

回答

せん ぶく ひで のぶ
泉福英信

国立感染症研究所 細菌第1部第6室長
〒165-8640
東京都新宿区戸山1-23-1

Q 自己申告しない患者さんに驚き

新聞報道によると、B型肝炎ウイルス（HBV）やヒト免疫不全ウイルス（HIV）の感染リスクが年々増加傾向にあるとされていますが、われわれ開業医にとってはあまり現実感がありませんでした。

しかしつい先日、当医院の歯科衛生士が患者さんとの会話から、その人がB型肝炎ウイルスの感染者であることが判明しました。う蝕の治療を始めてから3回目でしたから、すでに麻酔と観血的処置も行っていました。幸い予防接種をしていたのでパニックにはなりませんでしたが、予診表にも問診時のカルテにもその旨の記述は全くありませんから、本人からの申し出はなかったものと思われます。

当医院ではオートクレーブによる滅菌しかしていませんので、この件を機に滅菌・消毒システムを見直したいと考えています。また、自己の感染リスクをほとんど認識していないこのような患者さんとのように向き合うべきか、個人情報保護との絡みもあるのでとても難しい時代となったように感じます。

2007年4月からは診療所においても「安全」に関

スタンダードプリコーションとは

標準予防策。すべての患者（感染の有無にかかわらず）の血液、体液、排泄物は、“感染の疑いのあるもの”として取り扱うという概念です。

HIV、A型、B型、C型肝炎ウイルス、腸炎サルモネラ、赤痢菌、梅毒結核などに感染の恐れがある血液や体液。

+

血液を含まない唾液、鼻汁、糞便、精液、羊水、嘔吐物、痰、尿など

歯科では、血液、唾液、歯肉溝滲出液、剝離した組織、抜去歯牙および口腔軟組織、これらが付着したガーゼ、布、綿、グローブ、コップ等を防御対象物とします。

図1 スタンダードプリコーションとは。

して病院と同様の扱いになるとのことですが、それを踏まえての感染リスク抑制対策を講じたいと思っています。今後、リスク拡大傾向が続くとすればBクラス滅菌器導入だけでは済まないと思いますが、一般開業医としてどこまで感染症対策を行えばよいのか、教えていただきたいのです。

A 回答

「スタンダードプリコーション」（図1）という言葉をご存知ですか？ これは、すべての患者さん（感染の有無にかかわらず）の血液や唾液、体液、排泄物を、“感染の疑いのあるもの”として取り扱う概念です。これには、鼻汁や糞便、精液、羊水、嘔吐物、痰、尿なども含まれます。この概念をきちんと踏まえていれば、治療中にHBVによる感染が明らかになったとしても、何も変わらずに診療行為を行えることとなります。また、医療従事者として常に頭に入れておかなければならないことは、患者から患者、患者から歯科医療従事者、歯科医療従事者から患者への感染をくい止める、ということです。

消毒用エタノール		
+	+	+
塩化 ベンザルコニウム	グルコン酸 クロールヘキシジン	ポビドンヨード
ウエルバス	ヒビソフト	イソジンバーム
ベルコムローション	ヒビスコールS	
トリゾンラブ	ウエルアップ	
ホエスミンラビング		
ピオシラビング		

図2 速乾性手指消毒剤の種類。

これらを踏まえた院内感染対策とは、どのようなものなのでしょうか。そして、日々の歯科診療に無理なく取り入れることができたなら、感染対策は何も問題ないでしょう。それでは、われわれが進めている「歯科医療における院内感染対策の取り入れ方」について簡単にご紹介します。

術者側の対策

まず、基本は「不潔域」と「清潔域」をしっかりと区別することです。現在行っている歯科診療を院内感染対策のために、急に変更することは難しいでしょう。汚染しやすい治療行為や汚染している場所、器具等を明確にして、それに対処することに注目すれば、簡単に対応できます。

汚染しやすい所（部位）を考えると、まずは「手指」となりますので、患者さんごとに手指の洗浄、消毒を行い、①手袋を着用する、ということが必要になります。また、診療後は手袋を外し、手指の洗浄、消毒を行ってから、カルテ等への記載を行うこととなります。手袋を着けているから手指は汚染されないので手洗いは不要、という考えは間違いです。手袋には目に見えない穿孔が生じやすく、手袋を着けていても汚染されていることがあります。さらに、長期間の使用により、手指表面にいる微量な細菌が手袋の内側で急激に増えてくることもありますし、手袋を外す際の汚染も考えられます。手袋を着けた

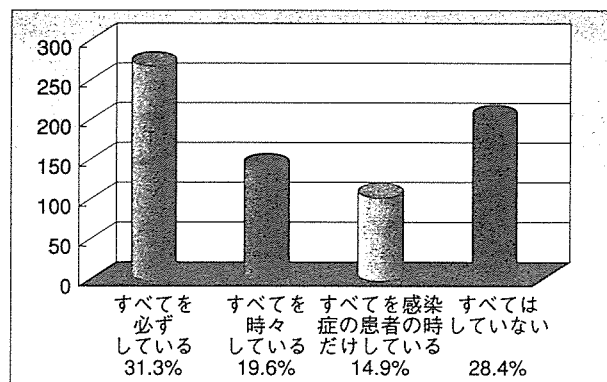


図3 防護用メガネ（フェースシールドを含む）、マスク、グローブのすべてを着用して診療している歯科医師の割合（平成16年度厚生労働省科学研究班（主任研究者：泉福英信）：「歯科医療における院内感染防止システムの開発」報告書より）。

ままカルテへの記載は、カルテを汚染させ、それを受け取った者への汚染拡大となりますので、言語断断です。手洗いは、流水と石鹸で行えば、十分に菌量を減らすことが可能です。汚れのひどい場合は、速乾性手指消毒剤（図2）を利用するのが効果的でしょう。

次は、②防護用メガネの着用です。診療中、特にタービンを使用しているときなどは、唾液や血液がエアロゾル化して空气中に舞い上がります。当然、微生物が含まれた微小なエアロゾルは目の中へ入り込みます。したがって、防護用メガネを着用することは感染防止につながるのです。

最後に、③マスクの着用です。治療中のエアロゾルが肺に入るのを防ぐ、また会話の際に術者の口腔内微生物が吐き出されるのを防ぐ意味で、マスクの着用が必要になります。

この3つの院内感染対策は簡単なようですが、臨床現場では十分に行われていないのが現実です。われわれが行った科学研究班の疫学調査では、手袋、防護用メガネ、マスクを同時に着用して診療している人の割合は全体の約30%前後でした（図3）。これは、アンケートに協力していただいた歯科医師（約20%の回収率）の集計結果ですから、全体ではもっと低いことが予想されます。

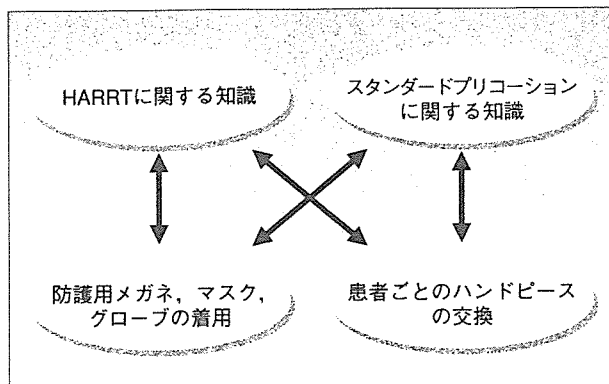


図4 質問項目におけるそれぞれの関連性（重回帰分析）（平成17年度厚生労働省科学研究班（主任研究者：泉福英信）：「歯科医療における院内感染防止システムの開発」報告書より）。

患者側への対策

患者に対しては、口腔微生物の量を限りなく減らしてから診療を行うほうが微生物の絶対量が減ることになり、当然、汚染量も減ってくると考えられます。その一番よい方法は洗口です。口腔では、微生物が歯表面や口腔粘膜等に付着して増殖しますので、洗口は一時的であっても物理的に微生物を除去するのに効果的な方法です。

また、ポビドンヨードやグルコン酸クロルヘキシジン等の抗菌性洗口剤を利用して洗口を行うケースもありますが、薬剤の使用は、水の場合と比較して著しく効果が上がるかどうかの結論が出ていません。いずれにしても、微生物を減らすという“感染リスクを限りなく減らす努力”が院内感染対策を行う上で重要、と考えられます。

器具の滅菌洗浄

使用済み器具の滅菌洗浄処理では、基本的に滅菌できるもの（一般診査用器具、外科器具、リーマー、バー、タービン、超音波スケーラーのハンドピース、チップ、スリーウェイシリンジ、印象用トレーなど）はオートクレーブを用い、オートクレーブを使用できない器具（バキュームチップ、印象用シリンジ、プラスチック製品など）は薬液により消毒することが必要です。

ここで重要なのは、消毒効果を上げるために洗浄

を先に行うことです。使用済み器具を集めてかごに入れ、流水下で洗浄します。次亜鉛素酸ナトリウム溶液やグルタルアル製剤などの薬液を入れた水槽に、一定時間漬けてから洗浄するのも効果的です。

知識と情報

病原体に関する知識を持つことも、重要な院内感染対策の1つです。われわれの行ったアンケート調査では、HIV感染者に対する治療方法である多剤併用療法（HARRT）を知っている歯科医師は、「防護用メガネ、マスク、手袋の着用」「患者ごとのハンドピースの交換」との相関性を示しました（図4）。敵を知ることが、最大の防御になるかもしれません。HIV、HBV、C型肝炎ウイルス（HCV）がどのようなメカニズムにより感染していくのか、感染力はどのくらいなのか、現在わが国でどのくらいの感染者がいて毎年どのくらい増えているのか、治療方法にはどういったものがあるのか等、知識を有しておく必要があると考えます。

SARS、鳥インフルエンザ、狂犬病など、日々新しい感染者が世界で発生し、日本へやってくるかもしれない昨今です。常にアンテナを張り、情報収集を行っておく必要もあります。歯科医師会や保健所等が主催する研修会等に積極的に参加したり、インターネットを利用して「院内感染」というキーワードで検索をかけて自分が必要とする情報を得るなど、日々の努力が必要と考えます。そのようにして得られた知識や情報は、一緒に働くスタッフにも伝えていくことを忘れてはいけません。

*

今回は、一般歯科医療を行う上での「院内感染対策の基本」ということで回答させていただきましたが、さらにもっとレベルを上げていくことも可能です。基本を忘れないで、あまり背伸びをせずに、自分の診療室に見合った対策を練ることがよい、と考えます。歯科医療に役立つ全身感染症の現状は、3月号でご紹介させていただきます。

歯科医療に関わる 全身感染症の最近の動向

せん かく ひで のぶ
泉福 英信

国立感染症研究所 細菌第1部第6室長
〒165-8640
東京都新宿区戸山1-23-1

はじめに

人類は様々な病原微生物と戦いながら進化を遂げている。細菌や真菌、原虫、ウイルス、プリオンなど様々な病原体が特定され、それらの治療や予防方法を研究開発し、常に延命に導く努力をしている。20世紀半ば以降では、ラッサ熱やエボラ出血熱、AIDS、重症急性呼吸器症候群（SARS）や鳥インフルエン

ザなど新たな病原体による感染症が発生し(図1)¹⁾、科学技術や経済の進歩とともにパンデミック（世界的流行）の危機に対応を迫られるようになってきた。その一方で、高齢者社会を迎える先進国が増え、一度制圧した感染症の再興や免疫力の低下に伴う弱病原性微生物による感染症発症など、新たな展開を見せ始めている。

歯科医療には唾液や血液が飛散する治療が多く、常に感染源からの汚染に晒されるという環境の下で

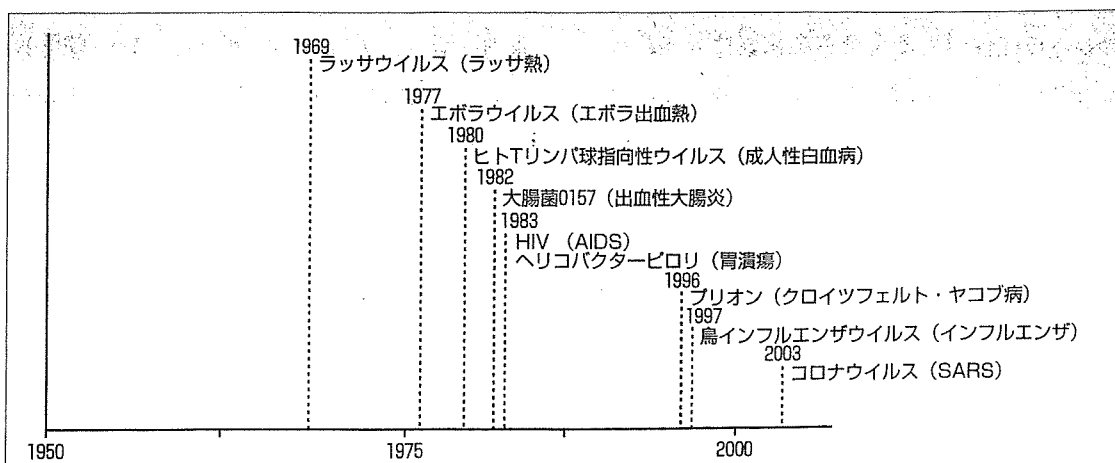


図1 近年同定された主な病原体の発生時期。

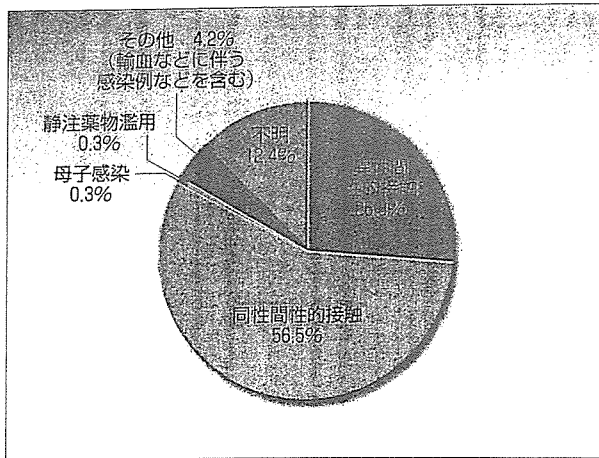


図2 HIV感染者およびAIDS患者における感染経路別感染者の割合 (平成18年3月27日～平成18年7月2日)。

治療が行われている。しかし日本において、歯科医療により感染が広がったというケースは特に証明されておらず、実際に感染があったとしても気がつかないケースが多い。また、これまでの国内における感染症の流行がそれほど大きなものにはならないで沈静化したことも、歯科医療が問題視されないで済んだ原因かもしれない。しかし、SARSや鳥インフルエンザのように変異を起こし、新たな病原性を獲得した病原体がヒトからヒトへ感染し、パンデミックに広がり始め、高齢化社会とともに易感染者も増加してきて病原体に感染されやすくなってきたら、歯科医療行為が感染を広げる原因として目に見えるようになるかもしれない。

本稿では、HIV、HBV、HCVなどを含めた歯科医療に関わる可能性のある全身感染病原体の現状を紹介するとともに、近年話題となっている感染症についても簡単に述べる。

I. 血液を介した感染症に関わる病原体

1. ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

日本における2006年3月27日～7月2日までの約3カ月間の新規HIV感染者報告数は248件(男性226件、女性22件、前回報告198件)で、過去最高とな

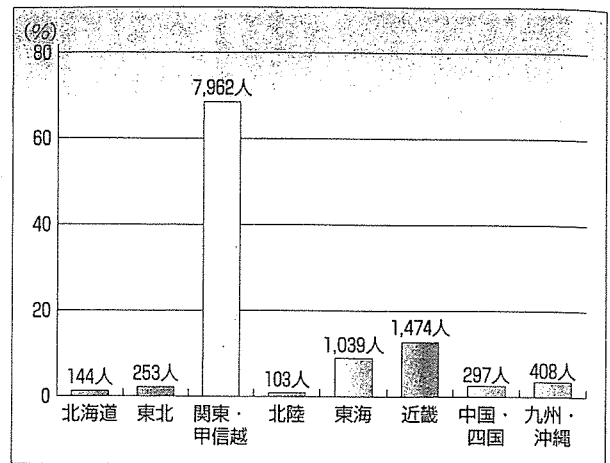


図3 HIV感染者およびAIDS患者のブロック別累積報告状況。

った²⁾。前年同時期の新規HIV感染者報告数は171件であった。一方、新規AIDS患者報告数は106件(男性97件、女性9件、前回報告92件)であり、過去2位となった。前年度同時期の新規AIDS患者報告数は89件である。

感染経路は、新規HIV感染者およびAIDS患者では同性間性的接触が202件(約57%)、異性間性的接触が93件(約26%)である(図2)。新規HIV感染者は、20～30代が多数(約66%)を占めるが、40代と50歳以上が増加してきている。また、HIV感染者およびAIDS患者の累計は7,838人および3,842人で、過去最高となった。地域別に見ると、関東・甲信越ブロックでHIV感染者およびAIDS患者ともに約68%と高率を示し、次に近畿ブロックの約12%、東海ブロックの約9%の順となった(図3)。

日本のHIV感染者およびAIDS患者数の累積報告が11,000人を超えたものの、世界的には感染レベルは低いままである。しかし、その増加率は加速的であり、まだ確認されていない潜伏感染者がこの数倍は存在することを考慮すると、“感染爆発が起っている”と考えてもよい状況である。しかし、その事実が国内で十分に周知されているとは言いがたく、危機感に乏しいのが現実である。

2. 肝炎ウイルス

肝炎ウイルスとは、ヒトに感染したときに、主に肝臓で増殖して肝臓の障害を起こすウイルスをいう。現在までB・A・D・E・Cの順に、5種類の肝炎ウイルスが発見されている。

①B型肝炎ウイルス (HBV)

HBVは、日本における散発性急性肝炎の原因としてA型肝炎について多い。成人で初感染の場合、多くは一過性の感染で自覚症状のないまま治癒し、20～30%の感染者が急性肝炎を発症する。初感染により発症した急性B型肝炎は、そのほとんどが性感染症 (STD: sexually transmitted diseases) と考えられている。その多くが、HBV感染者の血液を介して感染する。また、精液などの体液を介して感染することもある。歯科治療による感染が疑われたケースも認められている。持続感染者のうち10～15%が慢性肝疾患 (慢性肝炎、肝硬変、肝癌) を発症する。

急性B型肝炎と診断され報告された患者の数は、2003年まで減少傾向が認められたが、それ以降は横ばいに転じている。HBVキャリア数は130万人程度と推測されている。2002年～2006年の統計では、10代では男女とも同数であるが、それ以降では男性のほうが多い。

②C型肝炎ウイルス (HCV)

HCVはHBVと同じく、血液が直接体内に入ることによって感染する。その経路は、昔の輸血、HCVの混入した血液製剤、覚醒剤の注射、鍼治療、入れ墨などである。HCV感染の問題点は、60～80%という非常に高い慢性化率にある。HCVキャリアは、日本で約180万人存在すると推定されている。非活動期を経て、いったん肝炎の活動期に入ると、自然な鎮静化は期待できない。ひとたびC型肝炎硬変を発症すると、15年間で約90%の人が肝癌を合併するこ

とになる。

③重複感染

HIV、HCV、HBVはともに血液を介して感染するため、重複感染例が少ない。米国では、HIV感染例の約30%がHCVの重複感染をしていると推測されている。HIV治療方法として多剤併用療法 (HAART) の登場以降、日和見感染による死亡が減少し、肝疾患、特にC型肝炎とその合併症による死亡が増加してきている。

II. 呼吸器感染症に関わる病原体

ヒトは、1分間に16回ほど呼吸をしている。1回に吸い込む量は約500mlであることから、歯科の診療時間約30分当たり240lの量に相当する。この結果、歯科治療時に噴出、エアロゾル化し漂った唾液や血液に含まれる細菌やウイルスを、歯科処置中の歯科医師や歯科衛生士、周囲の患者が吸い込む機会は必然的に多くなる。待合室に複数の患者がいる状態で、仮に1人の感染者が咳をした場合、病原微生物が漂って他の患者に感染することも起こりうる。

このように、呼吸器感染症に関係する微生物の感染が歯科医院において起こる危険性は少なくない。以下に、呼吸器感染症を起こす病原体について述べる。

1. 鳥インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスはA～C型に分類され、ヒトが発症するのはA型とB型である。A型はさらにHとNに細かく分類されるが、通常流行するA型ウイルスはH1N1亜型とH3N2亜型である。鳥インフルエンザウイルスはH5N1亜型で、通常は鳥にしか感染しない「鳥の病気」である。しかし近年、鳥からヒトへの最初の感染 (患者) が1997年に香港で確認されて以来、「ヒトの病気」を発症させる病原

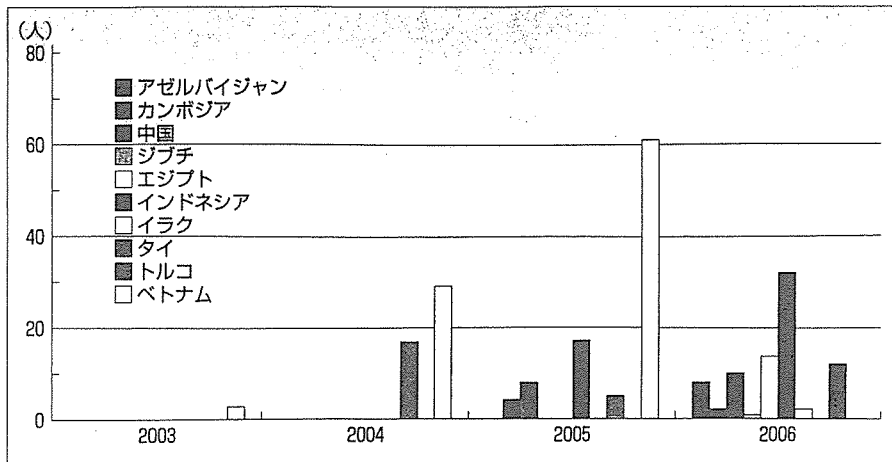


図4 ヒトの鳥インフルエンザ (H5N1) の年別感染者数。

体として注目されるようになった。その後、患者の発生は東南アジアを中心に拡大し (図4)、2006年10月現在、発症者数252人、死亡者148人 (死亡率58.7%) となっている。

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) がヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザに、いつ変異してもおかしくない状況になっている (不特定多数のヒト-ヒト間伝播は起っていないが、家族内伝播は報告されている)。そのため、1918年から1919年にかけて大流行したスペイン風邪 (H1N1, 世界で4,000万人、日本で38万人が死亡した) と同様に、世界的な大流行を起こす可能性がある、と考えられている。その結果、大きな健康被害をもたらし、社会的な活動や機能が停滞することが懸念されている。

初期症状は、突然の高熱 (38℃以上) と咳などの気道症状、全身倦怠などを伴うインフルエンザ様の症状である。ときに、下痢や嘔吐、腹痛、胸痛、鼻出血、歯科の領域で注目される歯肉出血のあることが報告されている。

2. SARS コロナウイルス

SARS コロナウイルスは、2002年11月に中国・広東省でヒトに感染し、肺炎を主症状とする全身感染症を引き起こした。そして、世界30カ国に拡散し、半年ほどの間に世界で8,000人以上の感染者と800人

近い死者を出した。SARSは、感染者の気道飛沫を介してヒトからヒトへ容易に感染し、航空機などにより短時間で世界に拡散する新しいタイプの新興感染症である。しかし世界保健機構 (WHO) 主導の国際的な封じ込め対策が功を奏し、同年7月、台湾での症例を最後に終息宣言が出された。その後、実験室レベルでの感染が認められたが、新たなウイルスによる感染者は認められていない。

3. 肺炎球菌

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は病原性が強く、呼吸器および耳鼻科領域感染症、敗血症、髄膜炎などを引き起こす。特に成人の市中肺炎 (30~50%) と髄膜炎 (30~40%) の起炎菌として、世界中で最も分離頻度の高い菌である。現在、この菌の各種抗菌薬に対する耐性化が、臨床上の重要な問題となっている。

4. マイコプラズマ

Mycoplasma pneumoniae 肺炎は市中肺炎の5~9%を占め、肺炎球菌、インフルエンザ菌について第3位の原因微生物となっている。マイコプラズマ肺炎は小児から若年成人が多い。以前は、オリンピックの年に大流行するという4年周期の発生ピークがあったが、近年はその傾向がなくなり、1990年以

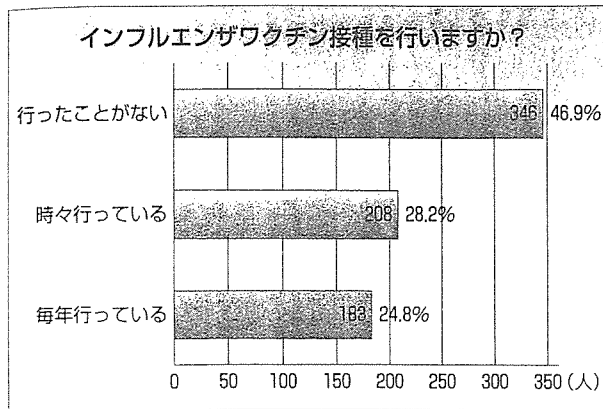


図5-a 「インフルエンザワクチン接種を行いますか?」への回答。

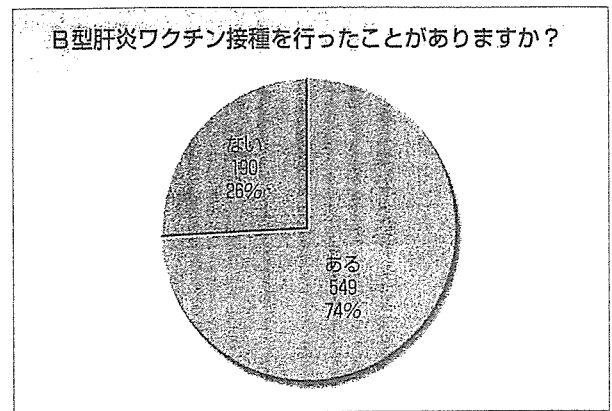


図5-b 「B型肝炎ワクチン接種を行ったことがありますか?」への回答。

降は年々増加してきている。

5. レジオネラ

レジオネラは細胞内寄生菌で、病原性が強く、エアロゾル感染により急性肺炎やインフルエンザ様の熱性疾患を惹起する病原性を持つ。早期から大葉性肺炎、多発性病変や肝機能障害などを起こし、診断と治療開始が遅れると急速な呼吸不全で致死的になる。1年間に約160名に及ぶ患者が発生している。レジオネラ症患者から分離される菌種の90%以上は *Legionella pneumophila* で、病原性を発揮する主な性質は、マクロファージの殺菌に抵抗し、その中で増殖し、結果的にその細胞を殺す能力を有することである。デンタルユニットの循環水からレジオネラが検出され、歯科医療従事者が慢性的に暴露されている例が国外において報告されている。

6. 結核

近年の結核危険率（1年間に新たに結核感染を受ける確率）は推定0.05%以下になっており、戦後（1951年、4%）に比べると極端に低下している。結核罹患率も人口10万人に対して23.3人（1951年、698）と激減したが、国際的にみると、罹患率は米国の5倍、英国の2倍である。新登録患者の60%が60歳以上で、この世代が戦前・終戦直後の結核蔓延時代に生まれ

育つ中で、結核菌の感染を高率に受け、感染を高年齢に持ち込んでいる。

7. その他

その他には、インフルエンザ菌や緑膿菌など呼吸器感染症に関わる微生物がある³⁾。

III. 唾液を介する感染症

EBウイルス

EBウイルスは、ヒトヘルペスウイルス科に属し、唾液に含まれているため口から口へと感染する。成人の約9割が感染していると言われている。母親と接触の多い乳幼児期に感染するケースが多いが、ほとんどの場合において発症しない。思春期以降に感染すると、伝染性単核症を発生する。バーキットリンパ腫や上咽頭癌も、EBウイルスが遺伝子となって発生する。

IV. 厚生労働科学研究班からの報告

平成16年度厚生労働科学研究事業「歯科医療における院内感染防止システムの開発」として、首都圏の歯科医師会に所属する3,912名を対象とした院内感染対策の意識調査を実施した。その中で、有効回答

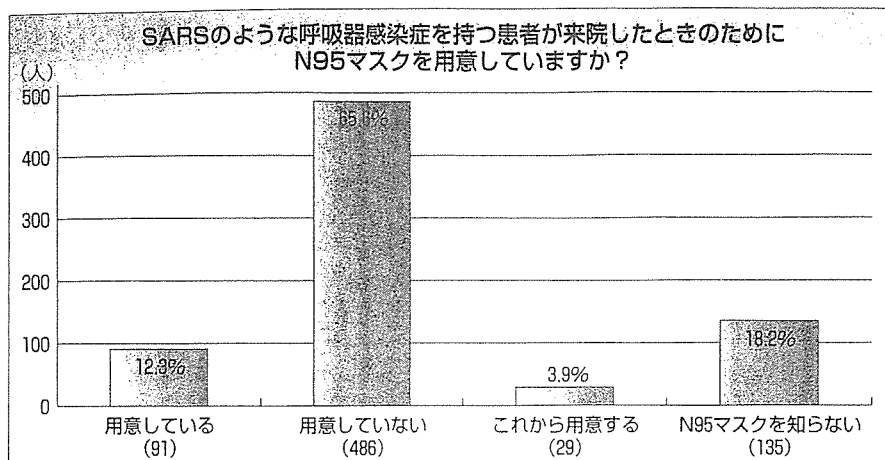


図6 「SARSのような呼吸器感染症を有する患者が来院したときのためにN95マスクを用意していますか？」に対する回答。

のあった742人 (19%) の「病原体に関わる意識」について紹介する。

「インフルエンザワクチン接種を行いますか？」や「B型肝炎ワクチン接種を行ったことがありますか？」という質問に対して、インフルエンザワクチン接種を「毎年行っている」と回答した人が24.8%、「時々行っている」と回答した人が28.2%で、B型肝炎ワクチン接種については「行ったことがある」と回答した人は74%であった (図5)。医療機関の従事者に対するワクチン接種は感染者を増やさないための有効な手段であるので、接種者をもっと増加させていく必要がある。

「SRASが唾液を介してヒトからヒトへ感染しますか？」という質問に対して、72.3%の人が「感染する」と答えた。また、「SARSのような呼吸器感染症を有する患者が来院したときのためにN95マスクを用意していますか？」という質問に対して、「用意している」と答えた人は12.3%であった (図6)。SRASは、病原体が含まれた気道分泌液を混入した唾液もリスク因子になるため、歯科医療において感染が広まる可能性の高い感染症である。このアンケート調査は、SARSの発症が認められた時期から1

年半後に行われた調査結果であり、決して意識が高いとは言えない。

おわりに

いつ何どき、いかなるタイプの病原体が蔓延しても対応できるように、感染症に対して準備していく姿勢が大切である。鳥インフルエンザであれば、WHO⁴⁾や厚生労働省⁵⁾が発表している警報等の情報をインターネットから引き出すなど、常に感染症に対して目を光らせることが重要である。このような努力が結果的に、患者と歯科医師との信頼関係につながっていく、と考える。

なお、歯科医療における具体的な院内感染対策については、次号で紹介する予定である。

参考文献

- 1) 吉開泰信編：ウイルス・細菌と感染症がわかる。羊土社，東京，2003。
- 2) 病原微生物検出情報。国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課，27(9)，2006。
- 3) 橋本章司，朝野和典：呼吸器感染症に伴う致命的病態。最新医学，61(2)：191-198，2006。
- 4) WHOの感染症の疫学情報 (Epidemic and Pandemic Alert and Response :EPR)：http://www.who.int/csr/disease/
- 5) 国立感染症研究所・感染症情報センター：http://idsc.nih.gov/jp/disease/influenza/05pandemic.html

キャピラリーフローセルシステムにおける 緑膿菌性バイオフィルムに対する抗菌薬の有効性評価

狩山玲子 光畑律子 上原慎也 門田晃一 公文裕巳
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学

I. はじめに

カテーテル留置複雑性尿路感染症をはじめとする慢性感染症において、細菌バイオフィルムの存在はその難治性の主たる要因となっている。岡山大学泌尿器病態学分野では、複雑性尿路感染症に対して、*in vitro* および *in vivo* の実験モデル系での治療実験を重ねてきた¹⁻¹⁰⁾。抗菌薬を含む抗バイオフィルム剤開発のための新しいバイオフィルム実験モデル系として数年前に導入したキャピラリーフローセルシステムは、再現性のある実験・評価系として進化を続けている¹⁰⁻¹²⁾。今回、キャピラリーフローセルシステムにおいて、従来の実験系で緑膿菌性バイオフィルムに対して併用効果を認めた抗菌薬（ホスホマイシン [FOM] とレボフロキサシン [LVFX]）を用いて評価を行い、新知見を得たので報告する。

II. 材料と方法

カテーテル留置複雑性尿路感染症患者由来の緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* OP14-210株を用いた。GFP (green fluorescent protein) 産生株は、GFPをコードしたプラスミド pMF230をOP14-210株に導入して、*P. aeruginosa* OP14-210 (pMF230) 株を構築した。ガラスキャピラリー中に菌液 (GFP産生株またはGFP非産生株) を接種して、37°C、2時間放置したのち、人工尿を20ml/hrで灌流させバイオフィルムを形成させた。人工尿における浮遊菌に対するFOMとLVFXのMICは、それぞれ64 μ g/mlと8 μ g/mlであった。薬剤濃度は、通常の臨床投与量で尿中に十分に到達する濃度 (FOM [192 μ

g/ml :3xMIC], LVFX [80 μ g/ml:10x MIC]) を使用した。GFP産生株が形成した薬剤無添加と薬剤作用後のバイオフィルムを共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。GFP非産生株の場合は、蛍光染色キット (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits:Molecular Probes) を用いてバイオフィルム内の生菌と死菌を染め分け、同様に観察を行った。

III. 結果

GFP産生株が3日後に形成したバイオフィルムは、100 μ m程度の厚さで全面を覆っていた (Fig. 1A)。GFP産生株に薬剤を作用させて3日後に観察すると、FOM単独 (Fig. 1B) では部分的にマッシュルーム状のバイオフィルムを形成するが、LVFX単独 (Fig. 1C)、FOM・LVFX併用 (Fig. 1D) ではマイクロコロニーが点在するもののバイオフィルムの形成は認めなかった。GFP産生株が1日後に形成したバイオフィルムに72時間薬剤を作用させると、FOM単独 (Fig. 2B)、LVFX単独 (Fig. 2C) では薬剤無添加 (Fig. 2A) の場合と比較して顕著な差を認めなかったが、FOM・LVFX併用 (Fig. 2D) ではバイオフィルムの厚さが半分程度となり、表面が解離 (剥離) したイメージが得られた。第39回緑膿菌感染症研究会講演記録¹⁰⁾ において報告したように、GFP非産生株が2日後に形成したバイオフィルムに18時間薬剤を作用させると、LVFX単独では浅層部 (表層部) に赤色に強く染まった死菌イメージを認めた。FOM単独では生菌イメージの分布が薬剤無添加と同程度であり、FOM・LVFX併用では深層部まで死菌イメージが観察され併用効果が認められた。今回の新知見として、LVFXを単

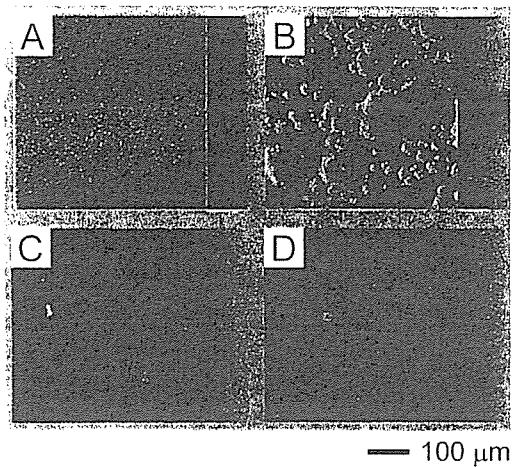


Fig. 1. Reconstructed three-dimensional images of GFP producing 3-day biofilm in the absence and presence of antimicrobial agents. Confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 510) with 20 x microscope objective was used to examine. A: control, B: fosfomycin (3 x MIC), C: levofloxacin (10 x MIC), D: fosfomycin (3 x MIC) plus levofloxacin (10 x MIC).

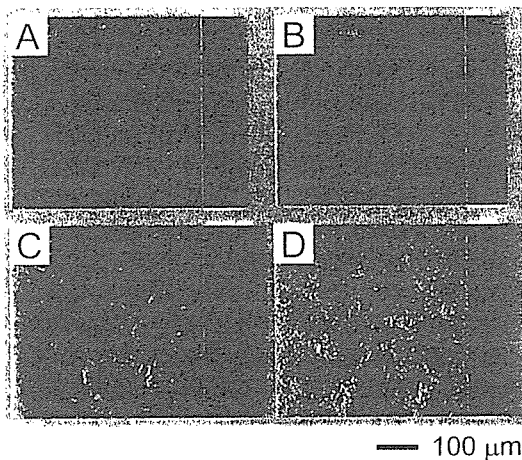


Fig. 2. Reconstructed three-dimensional images of GFP producing 1-day biofilm after 72-h treatment in the absence and presence of antimicrobial agents. Confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 510) with 20 x microscope objective was used to examine. A: control, B: fosfomycin (3 x MIC), C: levofloxacin (10 x MIC), D: fosfomycin (3 x MIC) plus levofloxacin (10 x MIC).

独で作用させたバイオフィームを100倍の対物レンズで観察すると個々の菌体を認め、浅層部 (Fig. 3A) では死菌 (赤色) が多く、深層部 (Fig. 3B) では生菌 (緑色) が多く存在するイメージが得られた。

IV. 考 察

生体の細菌バイオフィームは医学・歯学各科領域の枠を超えて理解されるべき病態であり、バイオフィーム感染症の予防と制御のための新しい治

療法・医療材料・抗バイオフィーム剤の開発は重要な研究課題である^{13,14)}。その中で、尿路バイオフィーム感染症は、通常臨床症状に乏しく比較的穏やかな感染症であるが、一旦、尿流障害を合併すると敗血症に移行し、宿主を重篤化させる¹⁴⁾。また、除菌が困難であるため感染が持続し、院内感染の感染源となっている。特に、緑膿菌はバイオフィーム形成能が高く、尿路バイオフィーム感染症の主たる原因菌である。細菌バイオフィームの関与が強い留置カテーテルのある複雑性尿路感染症においては、緑膿菌がもっとも高頻度に分離

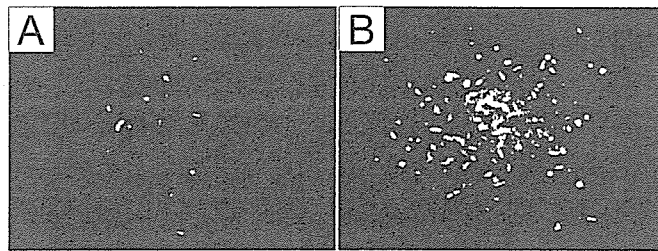


Fig. 3. Reconstructed three-dimensional images of 2-day biofilm after 18-h treatment with levofloxacin (10 x MIC). Confocal laser scanning microscopy with 100 x microscope objective was used to examine biofilms after staining with two-color fluorescence. Green and red signals are images for live and dead cells, respectively. A: upper layer, B: deeper layer.

され、多剤耐性緑膿菌の分離頻度も増加している。尿路バイオフィーム感染症の持続が宿主とそれを取り巻く環境におよぼす影響を考えると、除菌を目的とした治療方法の考案と積極的な予防策を講じる必要性はきわめて高いと考える。

フルオロキノロン系薬は緑膿菌性バイオフィームに対してある程度の効果を示すものの、単剤での効果は十分であるとは言えない¹⁵⁾。岡山大学泌尿器病態学分野では、岡山大学式ロビンスデバイスを用いて緑膿菌性バイオフィームに対するオフロキサシンとFOMの併用効果を確認⁵⁾、その作用機序は細胞壁合成阻害剤であるFOMによるフルオロキノロン系薬の菌体内取り込み量の増加であることを明らかにした⁶⁾。また、FOMはLVFXのみならず、ウリフロキサシン（プルリフロキサシンの活性本体）やシプロフロキサシンとも併用効果を示し、その程度は、3薬剤間で差異のないことを報告した^{7,8)}。さらに、キャピラリーフローセルシステムを使用して得られた成績の一部を第39回緑膿菌感染症研究会講演記録¹⁰⁾において報告したが、今回のGFP産生株を用いた検討においても、FOMとLVFXの併用効果が確認された。

以上の検討において、通常の臨床投与量で十分尿中に到達しうる薬剤濃度で併用効果が認められたことが重要な点である。In vitro 実験系は、臨床での併用効果のメカニズム解明と抗菌薬投与計画のエビデンス創出に有用であると考えられる。尿路の細菌バイオフィームは、カテーテル留置・尿路結石・尿路上皮の壊死部などを伴う症例で形成される。筆者らは、in vivo 実験系であるラット緑膿菌尿路感染症バイオフィームに対しても、

フルオロキノロン系薬とFOMの併用効果を確認した⁹⁾。フルオロキノロン系薬とFOMの併用により、短期間に解熱、菌陰性化が得られる可能性があり、有効症例の蓄積が期待される。

新しいバイオフィーム実験モデル系であるキャピラリーフローセルシステムは、緑膿菌性バイオフィーム（GFP産生株および非産生株）の観察において、再現性のある実験系として使用可能となった。本実験系は、新しい画像解析ソフトの導入により抗バイオフィーム剤探索のための基盤技術としてさらなる進化を遂げており、クォーラムセンシング阻害候補物質などの評価にも有用である。

V. 文 献

- 1) Kumon, H. : J. Infect. Chemother., 2:18-28, 1996.
- 2) 門田晃一、他 : 日本化学療法学会雑誌, 51: 426-430, 2003.
- 3) 門田晃一 : Bacterial Adherence & Biofilm, 17: 73-78, 2003.
- 4) 公文 裕巳 : Bacterial Adherence & Biofilm, 19: 9-16, 2005.
- 5) Kumon, H. et al. : Antimicrob. Agents Chemother., 39: 1038-1044, 1995.
- 6) Monden, K. et al. : J. Infect. Chemother., 8: 218-226, 2002.
- 7) Mikuniya, T. et al. : Acta Med. Okayama, 59: 209-216, 2005.
- 8) 三國谷 雄、他 : Bacterial Adherence & Biofilm, 17: 57-62, 2003.

- 9) 三國谷 雄、他 : Bacterial Adherence & Biofilm, 18: 11-16, 2004.
- 10) 狩山玲子、他 : 第39回緑膿菌感染症研究会講演記録, pp. 95-100, 2005.
- 11) 狩山玲子、他 : バイオフィルム実験講座, pp. 3-19, 2003.
- 12) Werner, E. et al. : Appl. Environ. Microbiol., 70: 6188-6196, 2004.
- 13) Hall-Stoodley, L. et al. : Nat. Rev. Microbiol., 2: 95-108, 2004.
- 14) 狩山玲子、他 : ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学, pp. 2-26, 2003.
- 15) Spoering, A. L. et al. : J. Bacteriol., 183: 6746-6751, 2001.

Evaluation of Effects of Antimicrobial Agents against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in a Capillary Flow Cell System

Reiko Kariyama, Ritsuko Mitsuhashi, Shinya Uehara, Koichi Monden and Hiromi Kumon
 Department of Urology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,
 Okayama University, Okayama, Japan

To identify antibiofilm agents, experimental models of complicated urinary tract infections (UTI) are utilized. Kumon et al. used modified Robbins devices and reported the synergy between ofloxacin and fosfomycin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. More recently, we began using a capillary flow cell system as an *in vitro* model. *P. aeruginosa* OP14-210 isolated from a patient with catheter-associated UTI was used. A GFP (green fluorescent protein)-producing strain, *P. aeruginosa* OP14-210 (pMF230), was constructed. Biofilms were grown in glass capillary tubes under continuous flow conditions with artificial urine, and were observed by confocal laser scanning microscopy. To evaluate the effects of potential antibiofilm agents, fosfomycin (FOM 3 times the MIC: 192 μ g/ml) and levofloxacin (LVFX 10 times the MIC: 80 μ g/ml) were tested. When both FOM and LVFX were added to the system 2-h after inoculation with the GFP-producing strain, very weak fluorescence signal indicating no biofilm formation was observed after 3-days. The GFP-producing 1-day biofilm after 72-h treatment with both FOM and LVFX was approximately half the thickness and irregular compared with no treatment or treatment with FOM alone or LVFX alone. The thickness of 2-day biofilms did not vary markedly after 18-h treatment with FOM or LVFX, either alone or in combination. BacLight staining was applied to assess the effects of treatment on the number of viable cells, and their distribution in biofilms. After combined treatment with FOM and LVFX, live and dead cells were distributed throughout the vertical profile of the biofilms, while a higher proportion of dead cells was observed in the upper third of the biofilms after treatment with LVFX alone. Our previous findings regarding the synergy between fluoroquinolones and FOM were confirmed using the present capillary biofilm system. Potential antibiofilm agents are currently under investigation.

Urinary Excretion of Anthocyanins in Humans after Cranberry Juice Ingestion

Ryoko OHNISHI,¹ Hideyuki ITO,^{1,†} Naoki KASAJIMA,² Miyuki KANEDA,² Reiko KARIYAMA,³ Hiromi KUMON,³ Tsutomu HATANO,¹ and Takashi YOSHIDA⁴

¹Department of Pharmacognosy, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Tsushima, Okayama 700-8530, Japan

²School of Pharmacy, Shujitsu University, Nishigawara, Okayama 703-8516, Japan

³Department of Urology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Shikata, Okayama 700-8558, Japan

⁴Matsuyama University, Bunkyo-cho, Matsuyama 790-8578, Japan

Received January 16, 2006; Accepted February 25, 2006; Online Publication, July 23, 2006

[doi:10.1271/bbb.60023]

Cranberry, which is rich in polyphenols, including anthocyanins and proanthocyanidins, has been found to have various effects beneficial to human health, including prevention of urinary tract infections. These effects have been associated with polyphenols in the fruit. We investigated the excretion of anthocyanins in human urine after ingestion of cranberry juice. Eleven healthy volunteers consumed 200 ml of cranberry juice containing 650.8 µg total anthocyanins. Urine samples were collected within 24 h before and after consumption. Six of 12 anthocyanins identified in cranberry were quantified in human urine by HPLC coupled with electrospray ionization and tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS–MS). Among these, peonidin 3-*O*-galactoside, the second most plentiful anthocyanin in the juice, was found most abundantly in urine within 24 h, corresponding to 41.5 nmol (56.1% of total anthocyanins). The urinary levels of anthocyanins reached a maximum between 3 and 6 h after ingestion, and the recovery of total anthocyanins in the urine over 24 h was estimated to be 5.0% of the amount consumed. This study found high absorption and excretion of cranberry anthocyanins in human urine.

Key words: anthocyanins; cranberry juice; human urine; HPLC–ESI/MS; MS–MS

Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait., Ericaceae), distributed in North America, has traditionally been used in the treatment and prevention of urinary tract infections, and has been reported to exhibit various biological properties, including inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus,¹⁾

protection against lipoprotein,²⁾ and *in vitro* anticancer activity.³⁾ Reduction of urinary tract infections in women by drinking cranberry juice was also proved in randomized, double-blind placebo-controlled trials.^{4,5)} Among the reported ingredients of cranberry, including proanthocyanidins,^{6,7)} anthocyanins,^{8–10)} flavonoids,^{11,12)} triterpenoids,¹³⁾ iridoids,¹⁴⁾ and organic acids,^{15,16)} the proanthocyanidins, fructose, and macromolecules¹⁷⁾ have been found to inhibit the adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells, and this might be associated with the prevention of urinary infection by cranberry.^{6,7)} On the other hand, the preventive effect on urinary infection has also been accounted for by the acidification of urine with hippuric acid (glycine-conjugate of benzoic acid), produced by the metabolism of quinic acid through benzoic acid.^{18,19)} Thus the *in vivo* urinary metabolites of the other polyphenolic ingredients, such as proanthocyanidins and anthocyanins, might also play an important role in the prevention of urinary tract infections.

Anthocyanins are widely distributed in fruits and vegetables such as blueberries, strawberries, cherries, plums, grapes, and red cabbage. The daily consumption of anthocyanins by humans has been estimated to be 180–215 mg/d in the United States,²⁰⁾ much higher than that of other flavonoids such as quercetin, kaempferol, and myricetin in the Dutch diet (23 mg/d).²¹⁾ Nevertheless, information about the rate and extent of absorption, metabolism, and excretion of cranberry anthocyanins in the human body is to date quite limited. The aim of the present study was to investigate the urinary excretion of anthocyanins in cranberry juice through the identification of metabolites in human urine

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-86-251-7926; E-mail: hito@cc.okayama-u.ac.jp

Abbreviations: HPLC–ESI–MS–MS, HPLC coupled with electrospray ionization and tandem mass spectrometry; DAD, diode array detector; TFA, trifluoroacetic acid

using the HPLC–ESI–MS–MS technique as described for various polyphenols.^{22–25)}

Materials and Methods

Materials and reagents. The cranberry juice (Cranberry UR-100, Kikkoman Corporation, Chiba, Japan) used in this study was prepared by concentration of fresh juice to about 1/5 volume, followed by adjustment with water and tasting agents (sugar and organic acid) to contain 100% solid body of the fresh juice. Cyanidins 3-*O*-galactoside chloride (ideain chloride), cyanidin 3-*O*-glucoside chloride (kuromanine chloride), and 6-hydroxyflavone were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). All solvents used for HPLC analysis were of HPLC grade.

Study design. After the study was approved by the ethical committee for human experimentation of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (ethics reference no. 1), all subjects provided written informed consent prior to participation. Eleven healthy volunteers in total (nine men and two women) aged 25.5 ± 4.9 years (mean \pm SD) followed an anthocyanin-free diet containing no fruits, vegetables, coffee, or tea, and were allowed to drink water from half a day before test ingestion to the next morning. All subjects consumed 200 ml cranberry juice at 9 AM. Blank urine samples were collected before dosing, along with individual urine over the next 24 h, in plastic bottles containing 1 ml 2% aqueous ascorbic acid and 1 M HCl, and were immediately stored in a freezer until analysis. The subjects were under their own control except for restriction of diet and drink throughout the study periods. They did not use any medications.

Analysis of anthocyanins in cranberry juice and urine. Anthocyanins in cranberry juice (Cranberry UR-100) and urine were quantified by HPLC–ESI–MS–MS. Urine samples (500 μ l) acidified with 1 M HCl (20 μ l) and 25% trifluoroacetic acid (TFA) (10 μ l), and spiked with 6-hydroxyflavone (50 μ M) in 0.58 M acetic acid (40 μ l) as an internal standard, were extracted with solid-phase extraction (SPE) cartridges (Bond-Elut C18, 50 mg/1 ml; Varian, CA, USA), which were washed with 0.5% TFA–methanol and equilibrated with 0.5% aqueous TFA before use. Urine samples loaded onto the cartridge were washed with 0.5% aqueous TFA, and anthocyanins were eluted with 0.5% TFA–methanol. The methanolic eluate was evaporated to dryness under nitrogen gas at ambient temperature. The residue was dissolved in 25% aqueous methanol containing 0.5% TFA (200 μ l), and filtered. An aliquot (20 μ l) of this solution was injected into an HPLC–ESI–MS–MS system and an HPLC equipped with diode array detector (DAD).

HPLC–ESI–MS–MS analysis was performed on a Hewlett-Packard 1100 HPLC system equipped with a

triple-stage quadrupole mass spectrometer, API 4000 (Applied Biosystems, Tokyo, Japan). The chromatographic column was a Nucleosil 100-5C18 (4.6 mm i.d. \times 150 mm, GL Sciences, Tokyo, Japan) maintained 40 °C, and the mobile phase consisted of acetonitrile–water–TFA (20:80:0.5, by vol.) (solvent A) and acetonitrile–water–TFA (95:5:0.5 by vol.) (solvent B). A gradient system was applied as follows: The proportion of solvent B in the eluent initialized at 0% ($t = 10$ min), increased from 0% to 100% ($t = 15$ min) and 100% ($t = 20$ min), and decreased back to 0% ($t = 20.1$ min) until the next injection ($t = 30$ min). The flow rate was 0.8 ml/min with 0.2 ml/min split directed to the mass spectrometer. Mass detection was carried out using an electrospray interface operating in positive-ion mode at 450 °C, with nebulizer pressure of 90 pounds per square inch, a drying nitrogen gas flow of 11 l/min, a fragmentor voltage of 20 V, and capillary voltage of 4,000 V. Ionization and fragmentation were optimized for authentic anthocyanins by direct infusion of a standard solution (0.2 μ M in 50% aqueous acetonitrile containing 0.5% TFA solution). The mass data were collected in multiple reaction monitoring (MRM) mode by the transition of parent and product ions specific for each anthocyanin at a dwell time of 80 ms. HPLC–DAD analysis was performed on a Hitachi diode array detector L-7455 monitoring absorbance at 524 nm, and a Hitachi L-2130 pump. Other HPLC methodology was as mentioned above.

Identification of the anthocyanins was based on the matching of molecular weight (parent and product ions) and retention time with those of available anthocyanin standards and a comparison of those reported HPLC–MS–MS data.^{8–10)} Anthocyanins were quantified by comparison with a standard curve obtained using known concentrations of an available standard, cyanidin 3-*O*-galactoside. The urinary concentrations of anthocyanins were determined based on the corrected peak area divided by the peak area ratios shown in Table 1. Calibration curves were prepared by spiking blank urine with solution at different concentrations (0.01–100 μ M), with duplicate injections at each level.

Statistical analysis. Values are given as means with standard errors.

Results and Discussion

Anthocyanins in cranberry juice

Anthocyanins constitute a large group of plant pigments distributed mainly in flowers, fruits, and vegetables. Cranberry contains large amounts of sugars, proanthocyanidins, flavonoids, and organic acids as well as anthocyanins. The structures of aglycone of 12 analyzed anthocyanins are depicted in Fig. 1. The ion chromatograms of cranberry juice analyzed by HPLC–ESI–MS–MS are shown in Fig. 2. By the HPLC–ESI–MS–MS method, 12 anthocyanins were identified by

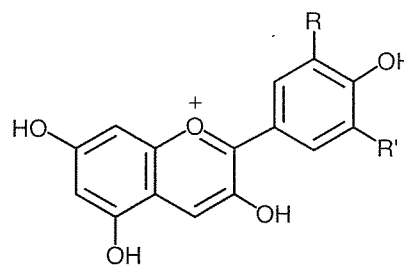
Table 1. Parent and Product Ions, Retention Times, and Peak Area Ratios of Anthocyanidins in Cranberry and Internal Standard

Anthocyanin	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Retention time (min)	Peak area ratio ^a
Cy 3- <i>O</i> -gal	449	287	4.53	1.0
Cy 3- <i>O</i> -glc	449	287	4.81	1.0
Cy 3- <i>O</i> -ara	419	287	5.79	1.6
Pn 3- <i>O</i> -gal	463	301	6.35	1.6
Pn 3- <i>O</i> -glc	463	301	7.07	2.6
Pn 3- <i>O</i> -ara	433	301	8.75	3.8
Dp 3- <i>O</i> -ara	435	303	4.60	— ^b
Pg 3- <i>O</i> -gal	433	271	5.58	—
Pg 3- <i>O</i> -ara	403	271	7.52	—
Pt 3- <i>O</i> -gal	479	317	4.98	—
Mv 3- <i>O</i> -gal	493	331	7.16	—
Mv 3- <i>O</i> -ara	463	331	10.03	—
6-Hydroxyflavone (Internal standard)	239	137	16.99	—

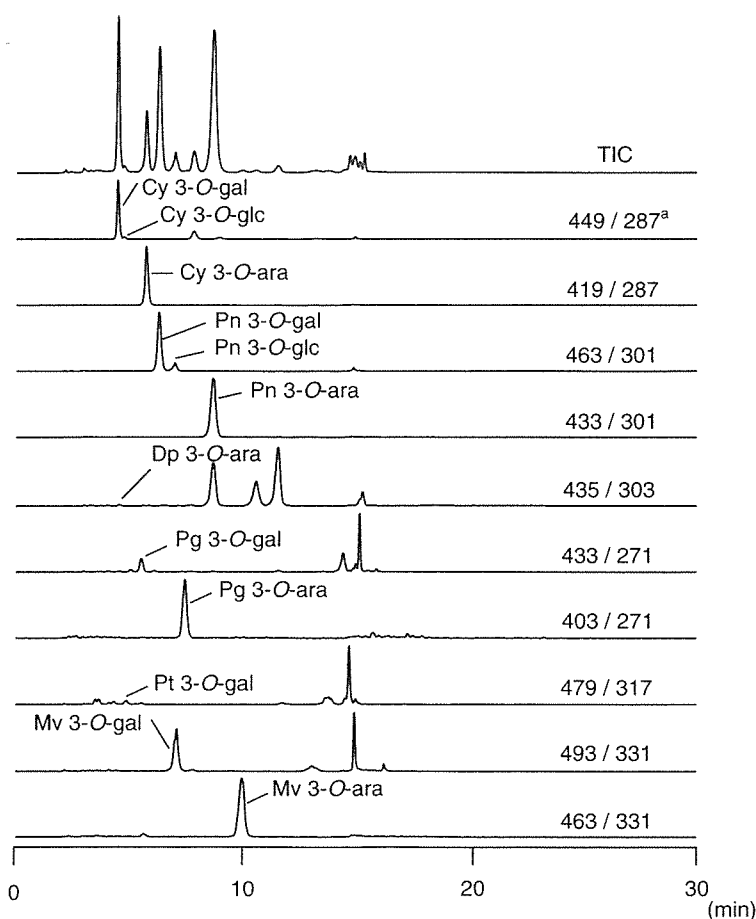
^aPeak area ratio calculated by HPLC-ESI-MS-MS versus HPLC-DAD at the same concentration of individual anthocyanins.

^bNot detected by HPLC-DAD.

Cy, cyanidin; Pn, peonidin; Dp, delphinidin; Pg, pelargonidin; Pt, petunidin; Mv, malvidin; gal, galactoside; glc, glucoside; ara, arabinoside



Anthocyanidin	R	R'
Pelargonidin (Pg)	H	H
Cyanidin (Cy)	OH	H
Delphinidin (Dp)	OH	OH
Peonidin (Pn)	OCH ₃	H
Petunidin (Pt)	OCH ₃	OH
Malvidin (Mv)	OCH ₃	OCH ₃

Fig. 1. Chemical Structures of Aglycones of Anthocyanins Used in the HPLC-ESI-MS-MS Assay.

Fig. 2. Total Ion Chromatogram (TIC) and Extracted Single Ion Chromatograms of Cranberry Juice Obtained by the HPLC-ESI-MS-MS Method in Multiple Reaction Monitoring Mode with Positive Ionization.

^aThe *m/z* values of parent/product ions.

comparing respective retention times and parent/product ion pairs with those of known standards, or by reference to the literature (Table 1).^{8–10,26} A significant difference was observed in the peak areas calculated by MS and UV for individual anthocyanins. In order to calculate a more accurate quantity value (Table 1), we took the peak area ratio of ionization by MS and UV absorbance at 524 nm by DAD of individual detectable anthocyanins into consideration. The concentrations of quantifiable anthocyanins in cranberry juice and urine, which were defined as cyanidin 3-*O*-galactoside equivalents, were determined by relating their peak areas to that of 6-hydroxyflavone as internal standard. The calibration curves was nicely linear over the concentration range (0.01–100 μM) studied, with correlation coefficients $r^2 > 0.995$. The limit of quantification ($S/N > 10$) was determined for all samples.

The total amount of quantifiable anthocyanins in cranberry juice was estimated at 650.8 $\mu\text{g}/200\text{ ml}$ ingested in the present study. Among these, peonidin 3-*O*-arabinoside, at a concentration of 230.0 $\mu\text{g}/200\text{ ml}$ juice, was the major anthocyanin in the juice, accounting for 35.3% of total quantifiable anthocyanins. Subsequently, the other anthocyanins, cyanidins 3-*O*-galactoside and 3-*O*-arabinoside, and peonidin 3-*O*-galactoside, at 19.7, 16.1, and 26.8% in total respectively, were predominant in the juice. The cranberry juice contained six types of anthocyanidin (cyanidin, peonidin, pelargonidin, malvidin, delphinidin, and petunidin), with two types of sugar form (galactoside and arabinoside). Furthermore, glucosides of cyanidin and peonidin were also present in the juice.

Human urine

The purpose of the present study was to identify potential metabolites of anthocyanins in human urine for a better understanding of the active principles in the prevention of urinary tract infection. Several human studies have reported that anthocyanins are recovered in urine in intact or conjugated forms.²⁷ In the present study, we found a higher excretion of several anthocyanin metabolites in human urine after a single dose of cranberry juice.

Figure 3 presents typical chromatograms of urine samples after consumption of cranberry juice, obtained by the HPLC–ESI–MS–MS method. The representative anthocyanins in the juice, peonidin 3-*O*-arabinoside, peonidin 3-*O*-galactoside, cyanidin 3-*O*-galactoside, and cyanidin 3-*O*-arabinoside, were observed in the urine of all subjects. Excretion of peonidin 3-*O*-glucoside, pelargonidin 3-*O*-arabinoside, and petunidin 3-*O*-galactoside among the minor pigments in the juice was also detected and identified in the urine of most of the subjects. Malvidin 3-*O*-arabinoside was not detected in any sample.

Table 2 gives the urinary excretion of individual cranberry anthocyanins after cranberry juice intake in the present study. The total excretion of six main

cranberry anthocyanins in urine over 24 h reached 5.0% of the amount consumed. Most studies have reported that relative urinary excretion of anthocyanins was very low, less than 0.1% of ingested pure anthocyanin or the foods containing it,^{28–33} indicating poor absorption and excretion of these compounds compared with other polyphenols,²⁷ but there are a few reports indicating higher anthocyanin levels in urine (up to a few percentage points) after red wine³⁴ or strawberry consumption.²³ The above data suggest that the absorption of anthocyanins is accelerated by other components in cranberry. It might also be due to a sufficient extraction procedure as well as high selectivity and sensitivity by the HPLC–ESI–MS–MS method. Following cranberry juice ingestion, almost all the urinary anthocyanins over 24 h were excreted as respective galactoside and arabinoside of cyanidin and peonidin, accounting for more than 90% of total anthocyanin excretion. Among these, the urinary concentration of peonidin 3-*O*-galactoside reached a level of $41.5 \pm 6.2\text{ nmol}/24\text{ h}$ (56.1% of total anthocyanin excretion). Up to 80% of the total anthocyanin dose and the main urinary anthocyanin, peonidin 3-*O*-galactoside, were excreted within 6 h post-consumption. The urinary excretion of all anthocyanins was maximal between 3 and 6 h after ingestion, and they were mostly exhausted in urine within 12 h, indicating that a major proportion of anthocyanins was quickly excreted in the urine (Fig. 4). Additionally, the urinary level (up to 11% of the dose) of peonidin glycosides over 24 h was remarkably higher than that of other glycosides (a few percentage points), except for peonidin arabinoside. The methylation of cyanidin glycosides into peonidin glycosides by catechol *O*-methyltransferase in the liver has been suggested in human and animal studies.^{35–41} The high excretion of peonidin glycosides in urine might have resulted partly from methylation of cyanidin glycosides. Although there is insufficient evidence for a metabolic difference among cyanidin glycosides, metabolic methylation for anthocyanins might occur preferably in the galactosides and glucosides over the arabinosides.

Moreover, some researchers have reported that the major metabolites of anthocyanins were recovered as their glucuronide conjugated forms in human urine following anthocyanin-rich food consumption.^{23,31,42} We evaluated for glucuronide conjugations by detection of their parent and product ion pairs due to the anthocyanidin glucuronides and anthocyanidins respectively. The peaks corresponding to the glucuronides of cyanidin and peonidin were not detectable in the extended single-ion chromatograms of human urine samples after cranberry juice intake, suggesting an absence of these glucuronide in the urine samples or degradation of conjugates during sample processing owing to instability.²³

In conclusion, 12 anthocyanins, including cyanidin, peonidin, delphinidins, pelargonidin, malvidin, and

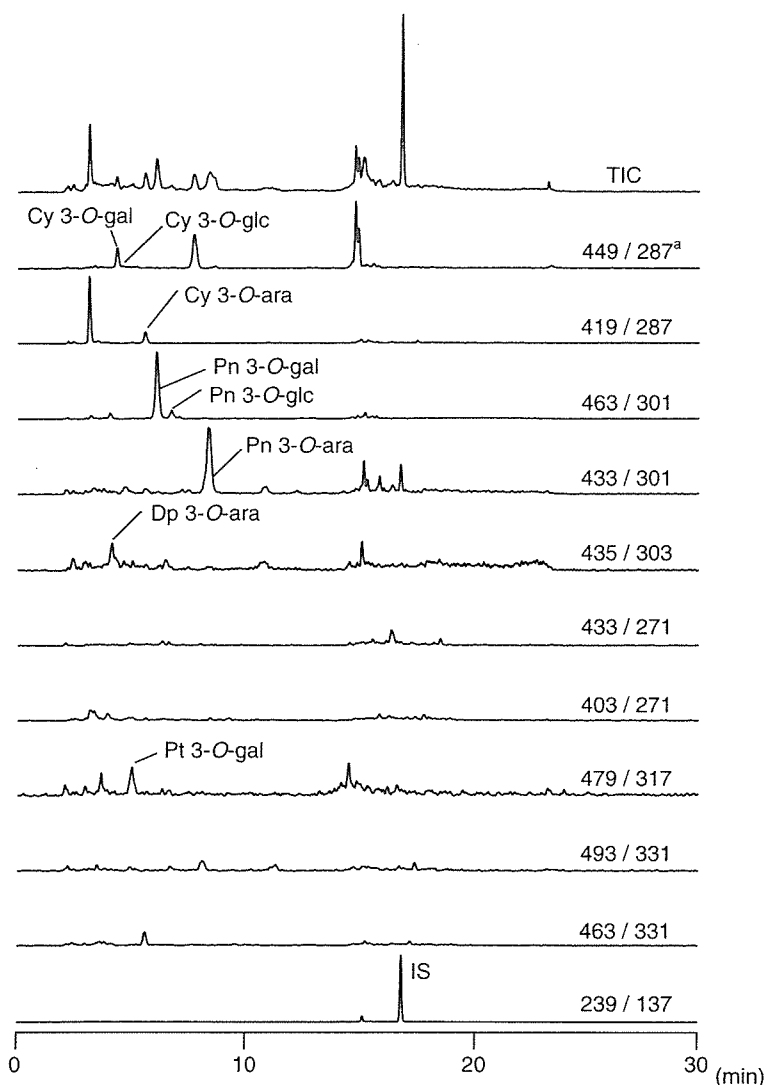


Fig. 3. Typical Extracted Single Ion Chromatograms of Human Urine Samples after Consumption of Cranberry Juice Obtained by the HPLC–ESI–MS–MS Method in Multiple Reaction Monitoring Mode with Positive Ionization. IS, internal standard. ^aThe *m/z* values of parent/product ions.

Table 2. Concentrations of Anthocyanins in Cranberry Juice and in Human Urine after Juice Consumption by 11 Healthy Volunteers

Anthocyanin	Cranberry juice		Urinary excretion		
	Concentration (µg/200 ml)	% of total anthocyanins ^a	Concentration ^{b,c} (nmol/24 h)	% of total anthocyanins ^d	% of dose ^{b,c}
Cy 3- <i>O</i> -gal	128.4	19.7	10.5 ± 1.7	14.3	3.7 ± 0.6
Cy 3- <i>O</i> -glc	3.6	0.6	0.11 ± 0.06	0.2	1.4 ± 0.7
Cy 3- <i>O</i> -ara	104.6	16.1	8.7 ± 1.2	12.0	3.6 ± 0.5
Pn 3- <i>O</i> -gal	174.3	26.8	41.5 ± 6.2	56.1	11.0 ± 1.6
Pn 3- <i>O</i> -glc	9.9	1.5	2.4 ± 0.6	3.3	11.3 ± 2.6
Pn 3- <i>O</i> -ara	230.0	35.3	10.4 ± 1.7	14.1	2.0 ± 0.3
total	650.8	100	73.6 ± 11.0	100	5.0 ± 0.8

^aPercentages of total quantifiable anthocyanins in cranberry juice.

^bValues are means ± SEM.

^cUrinary concentrations during 24 h following ingestion were determined using HPLC–ESI–MS–MS and HPLC–DAD, and were defined as cyanidin 3-*O*-galactoside equivalents.

^dPercentages of the total anthocyanins excreted in urine.

^ePercentages of ingested individual anthocyanin amounts.

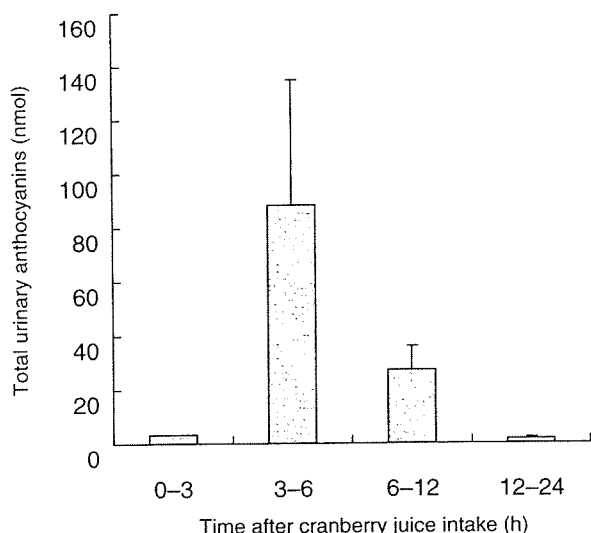


Fig. 4. Excretion of Total Anthocyanins in Human Urine after Cranberry Juice Intake.

Values are means \pm SEM ($n = 11$). Data are expressed as cyanidin 3-*O*-galactoside equivalents.

petunidin glycosides have been identified in cranberry juice. Six of them, *viz.* galactosides, glucosides, and arabinosides of cyanidin and peonidin, have also been quantified in urine after consumption of cranberry juice. These results show that the main anthocyanins in cranberry juice were absorbed into the human circulatory system and transported in the urine in intact form, which might contribute to the health benefits of cranberry. Identification and quantification of other polyphenols and their metabolites in human urine after cranberry juice intake are under investigation to clarify the active principles against urinary tract infection.

Acknowledgments

This study was supported in part by the Agricultural Chemical Research Foundation (no. 1-264 to H.I.), and by a Grant-in-Aid for Scientific Research (no. 17604005 to H.I.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan. The authors thank Kikkoman Corporation for supplying cranberry juice.

References

- Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E. I., Sharon, N., and Neeman, I., A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **29**, 295–301 (2000).
- Wilson, T., Porcari, J. P., and Harbin, D., Cranberry extract inhibits low density lipoprotein oxidation. *Life Sci.*, **62**, PL381–386 (1998).
- Bomser, J., Madhavi, D. L., Singletary, K., and Smith, M. A., *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med.*, **62**, 212–216 (1996).
- Avorn, J., Monane, M., Gurwitz, J. H., Glynn, R. J., Choodnovskiy, I., and Lipsitz, L. A., Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *JAMA*, **271**, 751–754 (1994).
- Kontiokari, T., Sundqvist, K., Nuutinen, M., Pokka, T., Koskela, M., and Uhari, M., Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and *Lactobacillus* GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *Br. Med. J.*, **322**, 1571–1575 (2001).
- Foo, L. Y., Lu, Y., Howell, A. B., and Vorsa, N., A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Nat. Prod.*, **63**, 1225–1228 (2000).
- Foo, L. Y., Lu, Y., Howell, A. B., and Vorsa, N., The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* *in vitro*. *Phytochemistry*, **54**, 173–181 (2000).
- Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., and Hammerstone, J. F., Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1270–1276 (2001).
- Zheng, W., and Wang, S. Y., Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 502–509 (2003).
- Wu, X., and Prior, R. L., Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC–ESI–MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2589–2599 (2005).
- Yan, X., Murphy, B. T., Hammond, G. B., Vinson, J. A., and Neto, C. C., Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5844–5849 (2002).
- Vvedenskaya, I. O., Rosen, R. T., Guido, J. E., Russell, D. J., Mills, K. A., and Vorsa, N., Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 188–195 (2004).
- Murphy, B. T., MacKinnon, S. L., Yan, X., Hammond, G. B., Vaisberg, A. J., and Neto, C. C., Identification of triterpene hydroxycinnamates with *in vitro* antitumor activity from whole cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3541–3545 (2003).
- Jensen, H. D., Krogfelt, K. A., Cornett, C., Hansen, S. H., and Christensen, S. B., Hydrophilic carboxylic acids and iridoid glycosides in the juice of American and European cranberries (*Vaccinium macrocarpon* and *V. oxycoccus*), lingonberries (*V. vitis-idaea*), and blueberries (*V. myrtillus*). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6871–6874 (2002).
- Blatherwick, N. R., The specific role of foods in relation to the composition of the urine. *Arch. Int. Med.*, **14**, 409–450 (1914).
- Blatherwick, N. R., and Long, M. L., Studies of urinary acidity. II. The increased acidity produced by eating prunes and cranberries. *J. Biol. Chem.*, **57**, 815–818 (1923).
- Zafriri, D., Ofek, I., Adar, R., Pocino, M., and Sharon, N., Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 92–98 (1989).

- 18) Kinney, A. B., and Blount, M., Effect of cranberry juice on urinary pH. *Nurs. Res.*, **28**, 287–290 (1979).
- 19) Kuzminski, L. N., Cranberry juice and urinary tract infections: is there a beneficial relationship? *Nutr. Rev.*, **54**, S87–90 (1996).
- 20) Kuhnau, J., The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, **24**, 117–191 (1976).
- 21) Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D., Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*, **20**, 21–29 (1993).
- 22) Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., Regerat, F., and Remesy, C., Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **279**, G1148–1154 (2000).
- 23) Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., and Remesy, C., Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J. Nutr.*, **133**, 1296–1301 (2003).
- 24) Ito, H., Gonthier, M. P., Manach, C., Morand, C., Mennen, L., Remesy, C., and Scalbert, A., Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *Br. J. Nutr.*, **94**, 500–509 (2005).
- 25) Ito, H., Gonthier, M. P., Manach, C., Morand, C., Mennen, L., Remesy, C., and Scalbert, A., High-throughput profiling of dietary polyphenols and their metabolites by HPLC–ESI–MS–MS in human urine. *BioFactors*, **22**, 241–243 (2004).
- 26) Duthie, S. J., Jenkinson, A. M., Crozier, A., Mullen, W., Pirie, L., Kyle, J., Yap, L. S., Christen, P., and Duthie, G. G., The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur. J. Nutr.*, **25**, 113–122 (2006).
- 27) Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Remesy, C., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 230S–242S (2005).
- 28) Nielsen, I. L., Dragsted, L. O., Ravn-Haren, G., Freese, R., and Rasmussen, S. E., Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2813–2820 (2003).
- 29) Netzel, M., Strass, G., Janssen, M., Bitsch, I., and Bitsch, R., Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **20**, 89–95 (2001).
- 30) Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., Hirayama, M., and Tsuda, T., Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1546–1551 (2001).
- 31) Wu, X., Cao, G., and Prior, R. L., Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J. Nutr.*, **132**, 1865–1871 (2002).
- 32) Mulleder, U., Murkovic, M., and Pfannhauser, W., Urinary excretion of cyanidin glycosides. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **53**, 61–66 (2002).
- 33) Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G., and Briviba, K., Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur. J. Nutr.*, **40**, 113–120 (2001).
- 34) Lapidot, T., Harel, S., Granit, R., and Kanner, J., Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4297–4302 (1998).
- 35) Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Fraisse, D., Lamaison, J. L., and Remesy, C., Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *J. Nutr.*, **132**, 1249–1253 (2002).
- 36) Tsuda, T., Horio, F., and Osawa, T., Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -D-glucoside in rats. *FEBS Lett.*, **449**, 179–182 (1999).
- 37) Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., and Someya, K., Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1083–1091 (1999).
- 38) Wu, X., Pittman, H. E., 3rd, and Prior, R. L., Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs. *J. Nutr.*, **134**, 2603–2610 (2004).
- 39) Ichiyangi, T., Shida, Y., Rahman, M. M., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., and Konishi, T., Metabolic pathway of cyanidin 3-O- β -D-glucopyranoside in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 145–150 (2005).
- 40) Kay, C. D., Mazza, G. J., and Holub, B. J., Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J. Nutr.*, **135**, 2582–2588 (2005).
- 41) Kay, C. D., Mazza, G., Holub, B. J., and Wang, J., Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Br. J. Nutr.*, **91**, 933–942 (2004).
- 42) Felgines, C., Talavera, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., and Remesy, C., Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7721–7727 (2005).