

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)

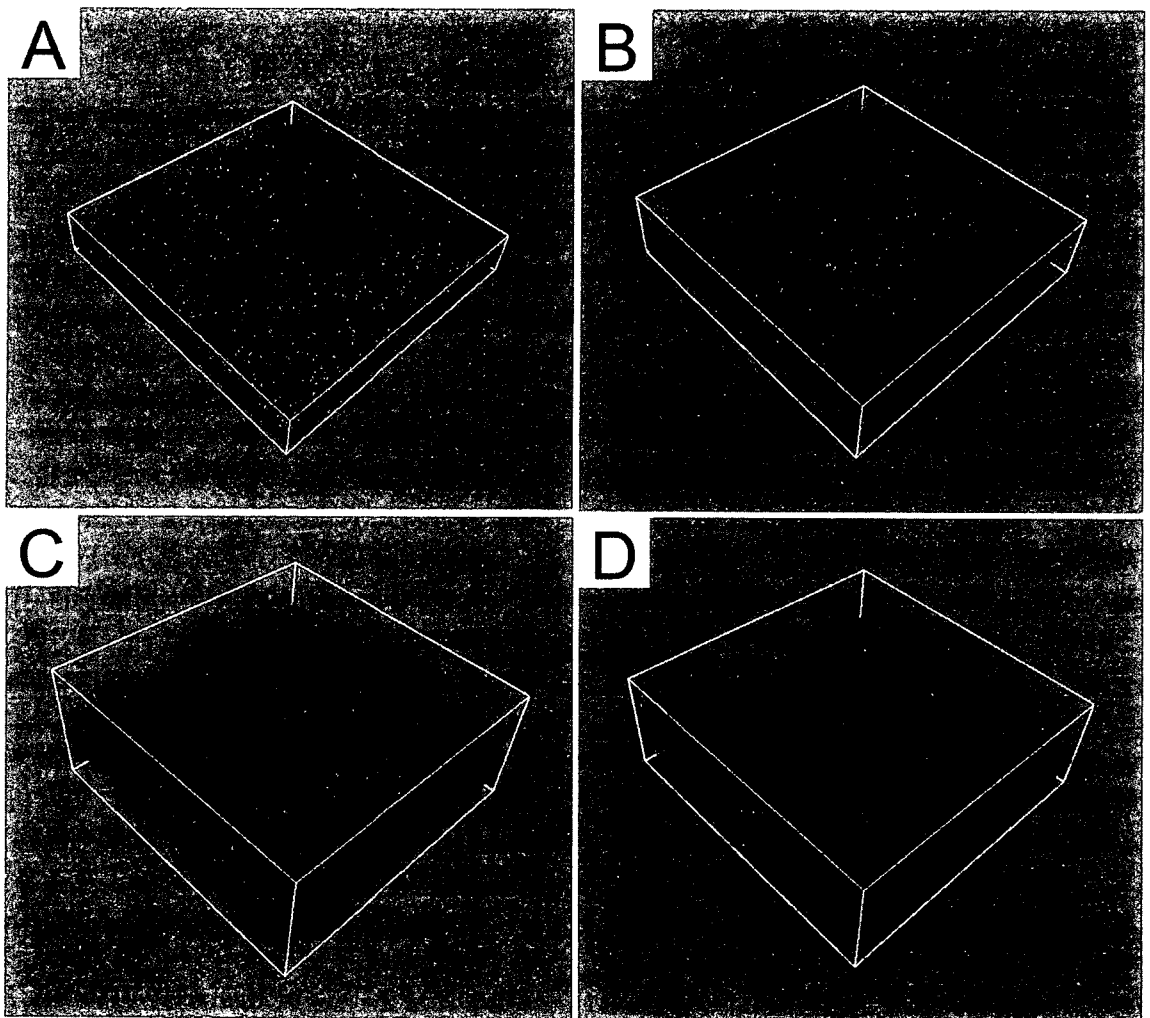


Fig. 2 Reconstructed three-dimensional images of GFP producing 1-day biofilm after 72-h treatment in the absence and presence of antimicrobial agents. Confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 510) with 20 x microscope objective was used to examine. A: control, B: fosfomycin (3 x MIC), C: levofloxacin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

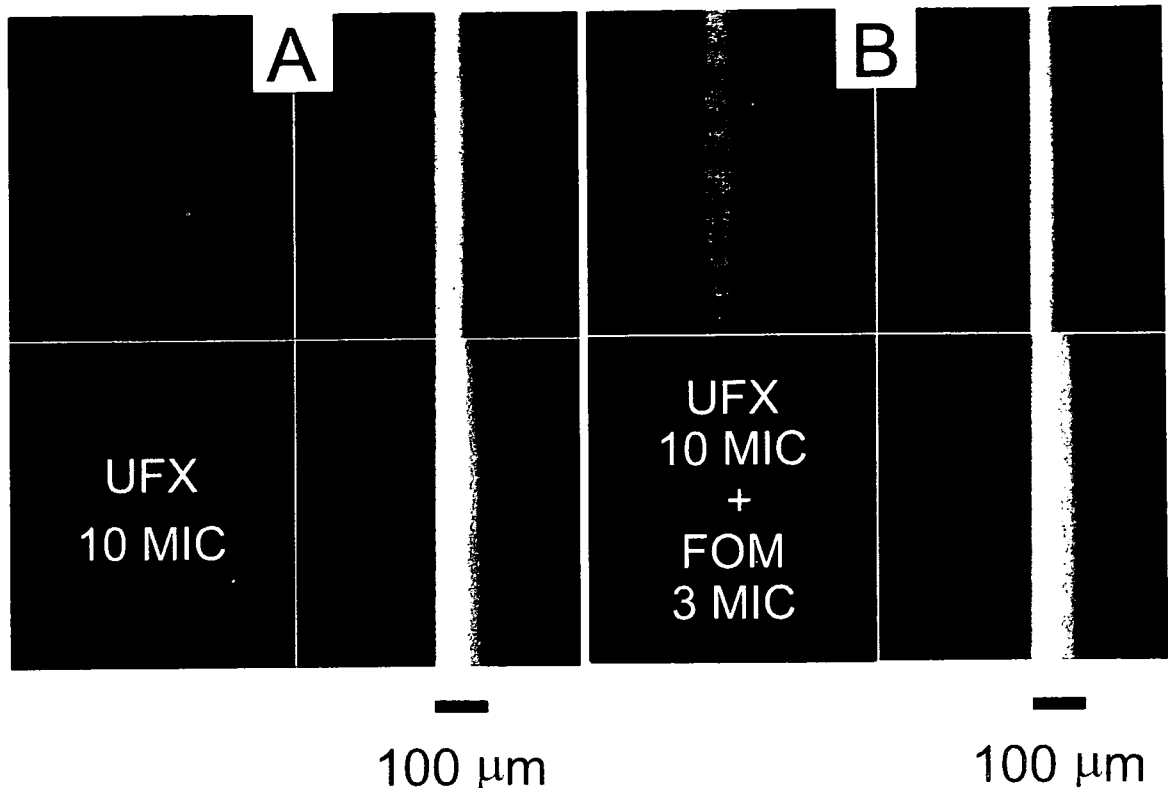


Fig. 3 Reconstructed three-dimensional images of 2-day *P. aeruginosa* biofilms after 18-h treatment with ulifloxacin alone and in combination with fosfomycin. A: ulifloxacin (10 x MIC), B: ulifloxacin (10 x MIC) plus fosfomycin (3 x MIC). Confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 510) with 20 x microscope objective was used to examine biofilms after staining with two-color fluorescence. Green (upper right) and red (upper left) signals are images for live and dead cells, respectively. The images in lower right are the combined signals of upper right and upper left.

III. 成績

GFP 産生株が3日後に形成したバイオフィルムは、100 μm 程度の厚さで全面を覆っていた (Fig. 1A)。GFP 産生株に FOM 単独を作用させて3日後に観察すると、部分的にマッシュルーム状のバイオフィルムを形成した (Fig. 1B)。LVFX 単独、LVFX・FOM 併用では、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を認めなかった (data not shown)。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) 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。LVFX 単独では、表面が剥離したイメージが得られた (Fig. 2C)。LVFX・FOM 併用では、併用効果としての剥離した薄いバイオフィルムが観察された (Fig. 2D)。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、UFX 単独では、浅層部に死菌 (red) が多く存在するイメ

ージが得られた (Fig. 3A)。UFX・FOM 併用では、深層部まで死菌 (red) が多く存在し、浅層部の大部分が死菌 (red) であるというイメージが得られた (Fig. 3B)。UFX 単独、LVFX 単独および UFX・FOM 併用、LVFX・FOM 併用を比較すると、いずれにおいても UFX が LVFX より強い殺菌効果を示した (data not shown)。Green/Red 蛍光強度は、UFX 単独が Green 58.63/Red 23.30、UFX・FOM 併用が Green 46.78/Red 51.60 であり、併用による殺菌効果の増強が定量的に確認できた。

IV. 考察

尿路バイオフィルム感染症に対して抗菌化学療法の絶対的適応となるのは、現時点ではその急性増悪期のみである。臨床症状の乏しい慢性期においては尿流動態の改善とバイオフィルム形成に關与する尿路基礎疾患の除去しか有効な方策はなく、原則として化学療法の適応はない。高齢者や重篤

な合併症のため根治的治療の適応にならない患者では、止むを得ず慢性感染症の持続を容認しているというのが現状である。しかし、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及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極めて高いと考える。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、緑膿菌が高頻度に分離され、多剤耐性緑膿菌（メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌）の分離頻度も増加している。

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¹⁹⁾。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 (*in vitro* 実験系) を用いて緑膿菌性バイオフィームに対する ofloxacin と FOM の併用効果を確認¹¹⁾、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¹²⁾。また、岡山大学式ロビンスデバイスを用いて、FOM は LVFX のみならず、UFX や ciprofloxacin とともに併用効果を示し、その程度は 3 薬剤間で差異のないことを明らかにした^{13, 14)}。キャピラリーフローセルシステム (*in vitro* 実験系) におけるフルオロキノロン系薬と FOM の併用効果は、本稿での成績および第 39 回・第 40 回の緑膿菌感染症研究会講演記録^{15, 16)} においてもそれらの成績の一部を報告した。さらに、ラットを用いた *in vivo* 実験系においてもフルオロキノロン系薬と FOM の併用効果を確認した^{17, 18)}。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フルオロキノロン系薬と FOM の併用効果を認めたことが重要な点である。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。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。

近年、細菌の集団状態を感知し、遺伝子発現を制御するクォーラムセンシング機構（細胞密度依存的制御機構）という概念が、細菌の世界に導入された^{20, 21)}。クォーラムセンシングはバイオフィーム形成にも深くかかわっており、この機構の解明はバイオフィーム対策への活路を拓くものと期待される²²⁾。緑膿菌をはじめとするグラム陰性菌

およびグラム陽性菌に関してもクォーラムセンシング機構の研究は進展しており、その阻害剤の開発研究がなされている^{23, 24)}。クォーラムセンシング機構の阻害剤が尿路バイオフィーム感染症の予防や治療に役立てられるのかどうかは、今後の課題であるが、一種の阻害剤で、病原性や薬剤抵抗性に関与する遺伝子の発現を同時に制御できるような抗バイオフィーム剤の開発が期待されている²⁵⁾。岡山大学泌尿器病態学分野においても、人工尿中、バイオフィーム形成阻害候補化合物の探索を行っている。今後、クォーラムセンシング機構の拮抗剤・阻害剤、ポリフェノール類の尿中代謝物、非翻訳 RNA 分子、抗菌薬などの評価（単独および併用）を行い、緑膿菌性尿路バイオフィームに対する予防法および治療法を開発を目指す。

V. 文 献

- 1) Hall-Stoodley, L. et al. : Nat. Rev. Microbiol., 2: 95-108, 2004.
- 2) Donlan, R. M. et al. : Clin. Microbiol. Rev., 15: 167-193, 2002.
- 3) Costerton, J. W. et al. : Sci. Am., 285: 60-67, 2001.
- 4) Davey, M. E. et al. : Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64: 847-867, 2000.
- 5) Kumon, H. : J. Infect. Chemother., 2: 18-28, 1996.
- 6) 公文裕巳 : Bacterial Adherence & Biofilm, 19: 9-16, 2005.
- 7) 狩山玲子、他 : 日本臨牀, 65(Suppl 2): 120-123, 2007.
- 8) 渡辺豊彦、他 : 第 41 回緑膿菌感染症研究会講演記録, 印刷中, 2007.
- 9) 門田晃一、他 : 日本化学療法学会雑誌, 51: 426-430, 2003.
- 10) 門田晃一 : Bacterial Adherence & Biofilm, 17: 73-78, 2003.
- 11) Kumon, H. et al. : Antimicrob. Agents Chemother., 39: 1038-1044, 1995.
- 12) Monden, K. et al. : J. Infect. Chemother., 8: 218-226, 2002.
- 13) Mikuniya, T. et al. : Acta Med. Okayama, 59: 209-216, 2005.
- 14) 三國谷 雄、他 : Bacterial Adherence & Biofilm, 17: 57-62, 2003.
- 15) 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.

- 16) 狩山玲子、他：第40回緑膿菌感染症研究会講演記録, pp.135-138, 2006.
- 17) Mikuniya, T. et al. : J. Infect. Chemother., in press, 2007.
- 18) 三國谷 雄、他：Bacterial Adherence & Biofilm, 18: 11-16, 2004.
- 19) Spoering, A. L. et al. : J. Bacteriol., 183: 6746-6751, 2001.
- 20) Van Delden, C. et al. : Emerg. Infect. Dis., 4: 551-560, 1998.
- 21) Zhang, L.-H. et al. : Mol. Microbiol., 53: 1563-1571, 2004.
- 22) Parsek, M. R. et al. : Trends Microbiol., 13 : 27-33, 2005.
- 23) Suga, H. et al. : Curr. Opin. Chem. Biol., 7: 586-591, 2003.
- 24) Otto, M. et al. : FEMS Microbiol. Lett., 241: 135-141, 2004.
- 25) Horswill, A. R. et al. : Anal. Bioanal. Chem., 387: 371-380, 2007.

***Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Urinary Tract Infections - The Search for Antibiofilm Agents -**

Reiko Kariyama, Koichi Monden and Hiromi Kumon

Department of Urology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

We are continuing efforts to identify antibiofilm agents using more suitable experimental models. In this study, a capillary flow cell system as an *in vitro* model of complicated urinary tract infections (UTI) is utilized. *Pseudomonas aeruginosa* OP14-210 isolated from a patient with catheter-associated UTI was used and 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, levofloxacin (LVFX 10 times the MIC: 80 µg/ml), ulifloxacin (UFX 10 times the MIC: 20 µg/ml) and fosfomycin (FOM 3 times the MIC: 192 µg/ml) were tested. When both LVFX and FOM 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 FOM alone was similar to that seen with no treatment. The irregular detached biofilm was observed by the treatment with LVFX alone. In combination of LVFX and FOM, the irregular detached biofilm was much thinner than that with LVFX alone. BacLight staining was applied to assess the effects of treatment on the number of live and dead cells, and their distribution in biofilms. A higher proportion of dead cells was observed in the 2-day biofilms after 18-h treatment with either UFX alone or in combination of UFX and FOM compared with either LVFX alone or in combination of LVFX and FOM. The quantitative analysis of the intensity of green and red signals confirmed the increased bactericidal effect by the combination of UFX and FOM compared with LVFX and FOM. 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.

尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィーム形成能と臨床的因子および薬剤感受性との関連性に関する検討

渡辺豊彦 上原慎也 光畑律子 和田耕一郎
石井亜矢乃 狩山玲子 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

1. はじめに

近年、細菌バイオフィームは臨床各科領域の難治性感染症に關与する病態概念として注目されており、分子生物学的手法を用いた病態の解明やバイオフィーム形成阻害による予防的治療方法の開発など基礎的・臨床的研究が展開されている¹⁻³⁾。

バイオフィーム細菌は菌自身が産生する菌体外多糖 (glycocalyx) に覆われていること、その菌体外多糖を介して間接的に粘膜やカテーテルなどの医療機材に定着し増殖すること、さらにバイオフィーム細菌は浮遊細菌と異なる遺伝子を発現し得ることなどから、バイオフィーム感染症は特有の病態を示す^{4,5)}。具体的には感染症そのものは粘膜刺激性が低く比較的炎症所見に乏しいものの、抗菌化学療法には抵抗性を示し、しばしば難治性となる。緑膿菌はバイオフィーム形成能が強い菌種であり、尿路バイオフィーム感染症の代表的な原因菌である。尿路バイオフィーム感染症の持続は、感染宿主のみならず病院内全体に対し臨床的問題を引き起こすことから適切な対応が要求される⁶⁻¹⁰⁾。

今回我々は、岡山大学病院泌尿器科において分離された尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィーム形成能を定量化し、臨床的因子（発熱・カテーテル留置の有無）および薬剤感受性との関連性について検討したので報告する。

II. 対象および方法

1. 対象

1993年から2005年までの13年間に、岡山大学病院泌尿器科において、尿沈渣で白血球 $> 5/\text{hpf}$ か

つ尿培養で 10^4 CFU/ml以上の菌量が検出された尿路感染症由来緑膿菌166株（1症例1株）を用いて検討した。

2. 臨床的検討

緑膿菌が分離された尿路感染症166例をレトロスペクティブに検討し、発熱の有無、カテーテル留置の有無で分類した。尿道カテーテル、腎ろう、尿管ステント、膀胱ろう症例をカテーテル留置ありと定義した。また、体温 37.5°C 以上を示し、かつ尿路感染症に起因すると判断した場合を有熱症例と定義した。

3. バイオフィームアッセイ

バイオフィーム形成能は、ポリスチレン製マイクロプレートを用いて、定量的に測定した。緑膿菌を trypto-soya broth (Nissui) で一晩培養した後、人工尿で100倍に希釈し、滅菌した96穴ポリスチレンプレートに分注した。 37°C で24時間培養後、プレートを蒸留水で洗い乾燥、2% crystal violet で45分間染色した。付着した crystal violet を5% 酢酸エタノールに溶解させ、マイクロプレートリーダーで吸光測定 (OD_{570} 値) を行った。

4. 薬剤感受性試験

各種薬剤の最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration : MIC) 値を Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) に準じた微量液体希釈法にて測定した。検討薬剤は piperacillin (PIPC), ceftazidime (CAZ), imipenem (IPM), gentamicin (GM), ciprofloxacin (CPFX) とした。薬剤耐性の判定は、CLSI の設定したブレイクポイント (MIC) に基づいた。

5. 統計学的解析

データの解析は Fisher の直接法または Mann-Whitney's *U* test を用い、 $P < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

III. 成績

1. 臨床背景

男性 130 例 (78.3%)、女性 36 例 (21.7%) と男性が多くを占めた。基礎疾患としては、尿路悪性腫瘍が 77 例で最も多く (46.4%)、次いで 27 例が神経因性膀胱であった (16.3%)。有熱症例は 44 例 (26.5%)、非有熱症例は 122 例 (73.5%) であった。また、カテーテル留置症例は 117 例 (70.5%) であった。その内訳は尿道カテーテルが 61 例 (36.7%) と最も多く、次いで腎ろう 24 例 (14.5%)、尿管ステント 21 例 (12.7%)、膀胱ろう 11 例 (6.6%) の順となっていた。

2. バイオフィーム形成能

緑膿菌 166 株の平均 OD₅₇₀ 値は 0.21 ± 0.02 (Mean \pm SE) であった (Fig. 1)。OD₅₇₀ 値の分布に基

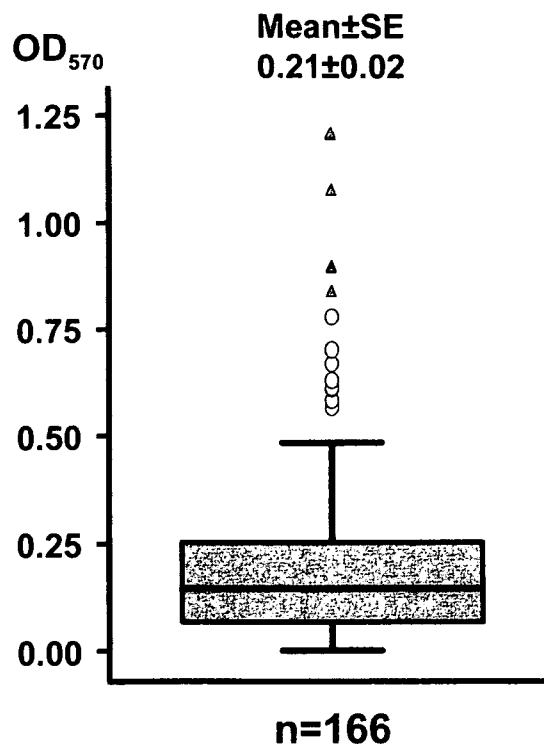


Fig. 1 Biofilm-forming capabilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

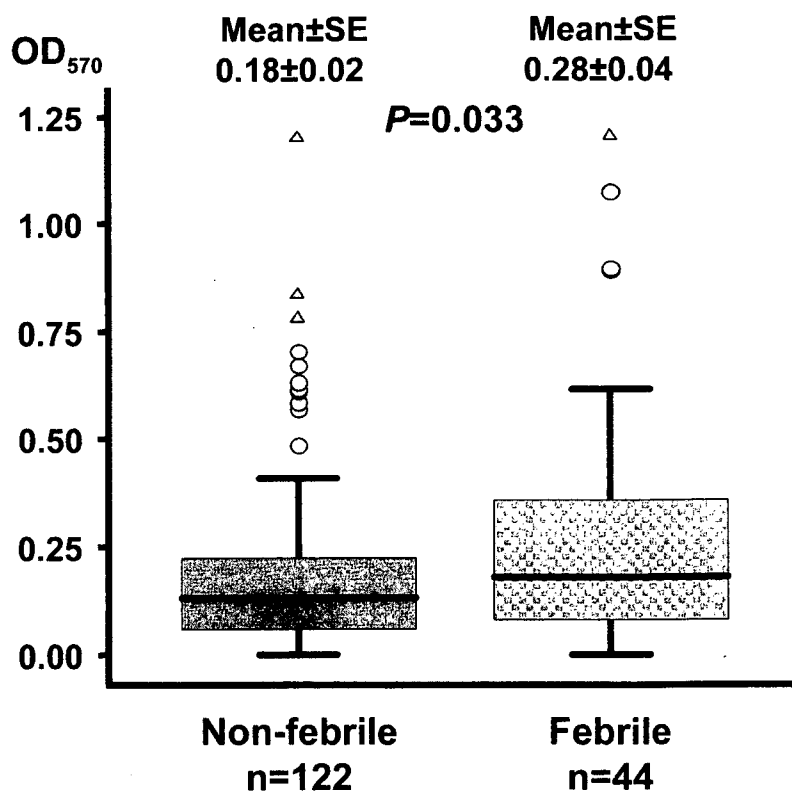


Fig. 2 Biofilm-forming capabilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in two groups; non-febrile and febrile episodes.

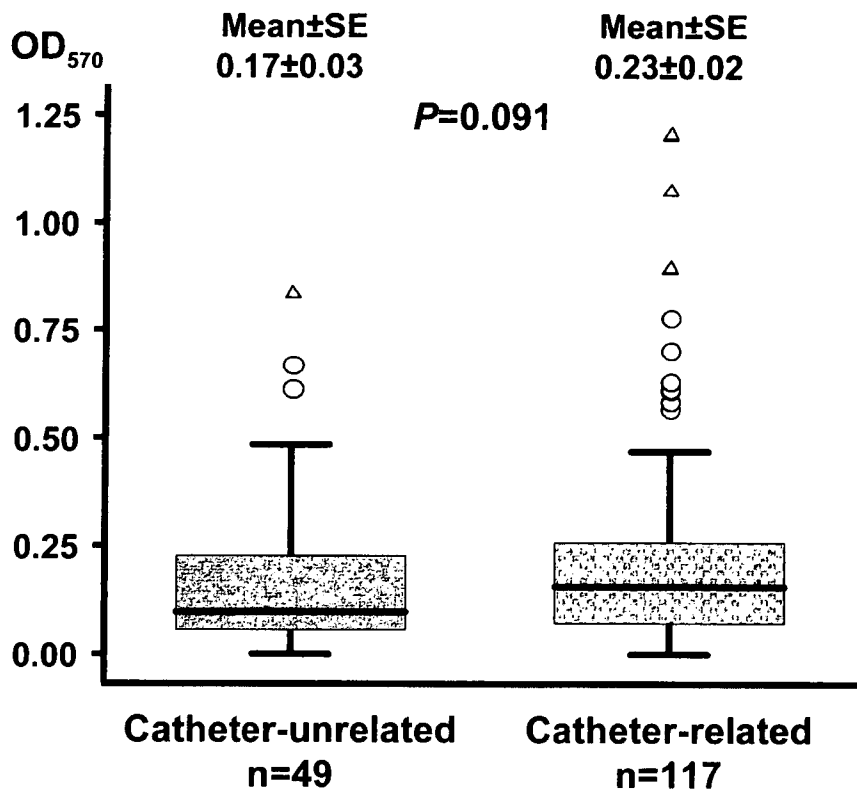


Fig. 3 Biofilm-forming capabilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in two groups; catheter-unrelated and catheter-related cases.

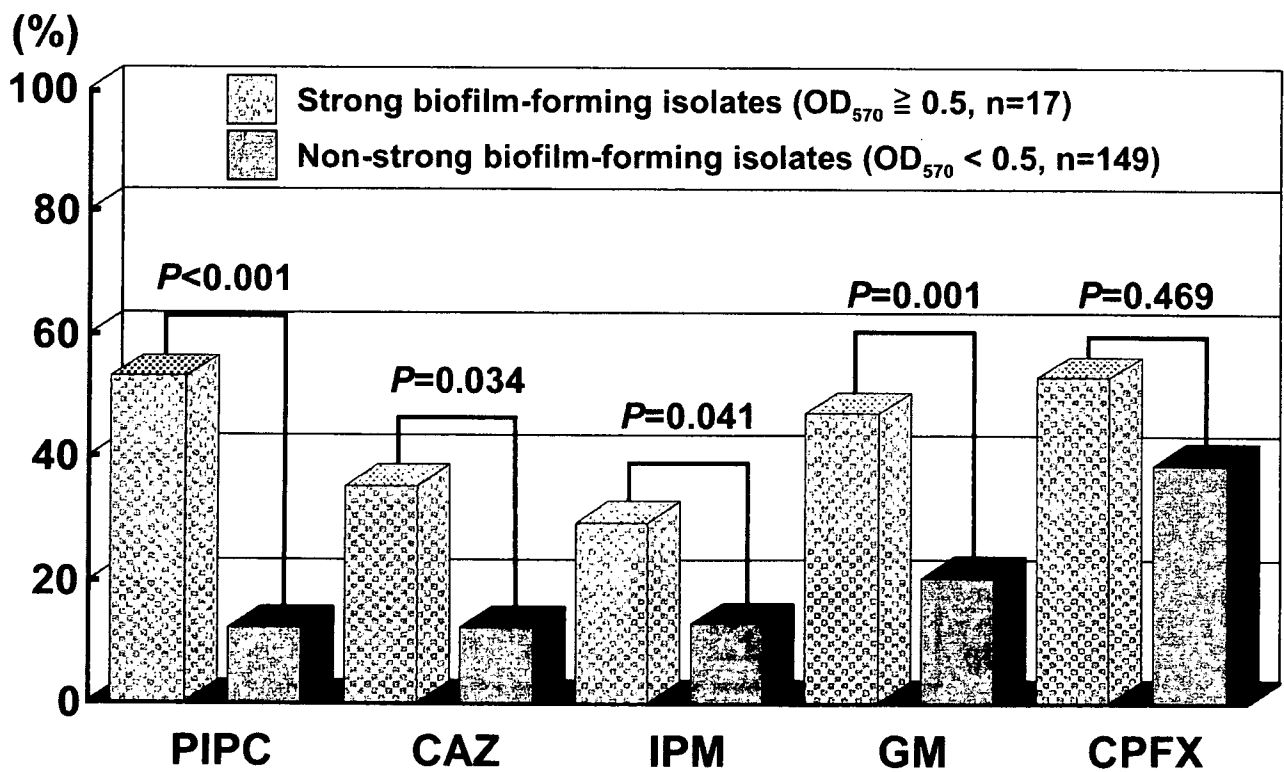


Fig. 4 Percentage of antimicrobial resistant isolates among strong biofilm-forming isolates and non-strong biofilm-forming isolates.

づき、バイオフィーム高度形成群 ($OD_{570} \geq 0.5$)、バイオフィーム非高度形成群 ($OD_{570} < 0.5$) に分類した。高度形成群は 17 株 (10.2%)、非高度形成群は 149 株 (89.8%) であった。

3. バイオフィーム形成能と発熱の有無との関連性
有熱群の平均 OD_{570} 値は 0.28 ± 0.04 、非有熱群では 0.18 ± 0.02 であり、有熱群が有意に高いバイオフィーム形成能を示した ($P=0.033$) (Fig. 2)。

4. バイオフィーム形成能とカテーテル留置の有無との関連性

カテーテル留置群の平均 OD_{570} 値は 0.23 ± 0.02 、カテーテル非留置群では 0.17 ± 0.03 であり、カテーテル留置群でバイオフィーム形成能が高い傾向を認めた ($P=0.091$) (Fig. 3)。

5. バイオフィーム形成能と薬剤感受性との関連性

PIPC, CAZ, IPM, GM, CFX いずれの薬剤においても、薬剤耐性群と感受性あり群のバイオフィーム形成能に有意差を認めなかった (data not shown)。しかしながら、いずれの薬剤においても、バイオフィーム高度形成群 ($OD_{570} \geq 0.5$) は非高度形成群 ($OD_{570} < 0.5$) に比して薬剤耐性化傾向を認め、PIPC, GM, CAZ, IPM では有意差を認めた (Fig. 4)。

IV. 考 察

異物や粘膜に付着した細菌は自己の生育に不利なストレス環境を感知し、菌体外多糖を産生することにより強固に定着し増殖を続け、複数の多糖体を中心とするポリマーで包まれた細菌バイオフィームを形成する^{1,4)}。泌尿器科領域では、尿路内に腫瘍や結石などの新生物や異物を形成するという疾患の特性や内視鏡手術に伴いステントやカテーテルを多用する治療法の特徴から、尿路バイオフィーム感染症を発症する可能性が高い。尿路に基礎疾患を有する複雑性尿路感染症では、病態が複雑化するにつれて弱毒菌や耐性菌の分離頻度が増加し、カテーテル留置症例では緑膿菌が最も高頻度に分離される^{7,10)}。今回の検討においても、全例が尿路悪性腫瘍や神経因性膀胱を中心とした複雑性尿路感染症であった。特に、カテーテル留置率は 70.5% と高率であり、緑膿菌性尿路感染症とカテーテル留置の強い関連性が示唆された。

尿路に形成された細菌バイオフィームは、付

着・定着因子としての役割だけでなく、抗菌薬や生体側からの感染防御系に対して抵抗因子となることから、尿路バイオフィーム感染症はしばしば難治性を示す^{6,10)}。特に、バイオフィーム形成の場となった基礎疾患が存続する症例では除菌が困難となる。抗菌化学療法が施行されて見かけの上の除菌が得られても極めて短期間に同一細菌によって再燃することから、基礎疾患の除去が治療の基本となる。尿路バイオフィーム感染症は、尿流動態が良好に保たれていれば、発熱などの急性症状を呈することはまれである。しかしながら、結石の嵌頓やカテーテル閉塞などにより尿流障害が生じると、尿路内圧の急激な上昇を引き起こし、細菌は機械的に腎実質および血中に侵入する。その結果として、尿性敗血症などの重症感染症に移行する^{6,7)}。

今回我々は、尿路感染症より分離された緑膿菌のバイオフィーム形成能をマイクロプレート法により定量化し、バイオフィーム形成能と臨床的因子 (発熱・カテーテル留置) との関連性を検討した。その結果、有熱症例群は非有熱症例群に比し有意にバイオフィーム形成能が高く、また、カテーテル留置症例群は非留置症例群に比しバイオフィーム形成能が高い傾向を認めた。これはカテーテル表面でバイオフィーム形成能の高い緑膿菌が選択され、付着・定着したためと推測される。また、バイオフィーム形成能が高いと、バイオフィーム自身やそれに付着するカチオンなどにより感染結石を形成したり、カテーテル内腔を閉塞させ尿路内圧の上昇をきたす危険性が高い^{6,7)}。そのため、有熱症例群ではバイオフィーム産生能が高い緑膿菌が多く分離されたものと考えられる。

さらにバイオフィーム形成能と薬剤感受性との関連性についても検討した。その結果、バイオフィーム高度形成群の耐性率は 5 薬剤全て (PIPC, CAZ, IPM, GM, CFX) において高く、PIPC, GM, CAZ, IPM では有意差を認めた。つまり、高度バイオフィーム形成能を持つ緑膿菌は多剤耐性の傾向を持つことが示された。このような特性を持つ緑膿菌が起炎菌の尿路感染症は難治化しやすい。そのため、抗菌薬による治療を繰り返すことになり、様々な抗菌薬に暴露されることにより細菌自体も薬剤に抵抗性を示すことが推測される¹¹⁾。また、バイオフィーム内に生息する細菌は浮遊細菌とは異なる遺伝子を発現して薬剤に抵抗性を示す可能性がある¹²⁾。Whiteley ら⁵⁾ は、バイオフィーム形成菌と浮遊菌での遺伝子発現の違いについ

て、緑膿菌を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、発現状況の異なる遺伝子はわずか 1% 程度にすぎないことを明らかにした。さらに、バイオフィーム形成菌において発現抑制を認めた *rpoS* 遺伝子に着目して、その変異株での検討を行い、バイオフィーム形成能の増加がトブラマイシンの感受性低下に関与することを証明している⁵⁾。これらのことから、バイオフィーム内で特別な制御を受ける遺伝子が少数ながら存在しており、抗菌薬に抵抗性を示すことが推測された。

今回の検討成績から、カテーテル留置尿路感染症から分離される緑膿菌は、バイオフィーム形成能が高く、抗菌薬に対して多剤耐性化傾向を示し、臨床的にも発熱症例の増加など問題が多いことが示唆された。

V. 文 献

- 1) Hall-Stoodley L. et al. : Nat. Rev. Microbiol., 2: 95-108, 2004.
- 2) Donlan R. M. et al. : Clin. Microbiol. Rev., 15: 167-193, 2002.
- 3) Costerton J. W. et al. : Sci. Am., 285: 74-81, 2001.
- 4) Lindsay D. et al. : J. Hosp. Infect., 64: 313-325, 2006.
- 5) Whiteley, M. et al. : Nature, 413: 860-864, 2001.
- 6) Kumon, H. : J. Infect. Chemother., 2: 18-28, 1996.
- 7) 門田晃一、他 : 日本化学療法学会雑誌, 51: 426-430, 2003.
- 8) 門田晃一 : Bacterial Adherence & Biofilm, 17: 73-78, 2003.
- 9) 公文裕巳 : Bacterial Adherence & Biofilm, 19: 9-16, 2005.
- 10) 狩山玲子、他 : 日本臨牀, 65(Suppl 2): 120-123, 2007.
- 11) Hoffman, L. R. et al. : Nature, 436 : 1171-1175, 2005.
- 12) Mah, T.-F. et al. : Nature, 426 : 306-310, 2003.

Relationships between biofilm-forming capabilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical background/antimicrobial resistance in urinary tract infections

Toyohiko Watanabe, Shinya Uehara, Ritsuko Mitsuhata, Koichiro Wada, Ayano Ishii, Reiko Kariyama, Koichi Monden and Hiromi Kumon

Department of Urology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

We investigated the relationships between biofilm-forming capabilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical background/antimicrobial resistance in urinary tract infections (UTI). Over a 13-year period from 1993 through 2005, a total of 166 *P. aeruginosa* isolates were collected from patients (one isolate per patient) with UTI at Okayama University Hospital. We used the *in vitro* microtiter plate assay to quantify biofilm formation and classified those into two groups; strong biofilm-forming isolates ($OD_{570} \geq 0.5$) and non-strong biofilm-forming isolates ($OD_{570} < 0.5$). The associated medical records were retrospectively reviewed for febrile (≥ 37.5 °C) or non-febrile episodes (< 37.5 °C) and catheter-related or catheter-unrelated cases. The biofilm-forming capabilities of *P. aeruginosa* isolates from febrile episodes (0.28 ± 0.04) and/or catheter-related cases (0.23 ± 0.02) were greater than those from non-febrile episodes (0.18 ± 0.02) and/or catheter-unrelated cases (0.17 ± 0.03). The percentage of *P. aeruginosa* isolates exhibiting antimicrobial resistance to piperacillin, ceftazidime, imipenem, gentamicin and ciprofloxacin was higher among strong biofilm-forming isolates than among non-strong biofilm-forming isolates. These results suggested that the persistence of *P. aeruginosa* in the urinary tract is due to biofilm formation exhibiting antimicrobial resistance as well as multiple resistance mechanism of *P. aeruginosa* itself.

投稿



再使用した気管内吸引カテーテルの 走査型電子顕微鏡による汚染状況の 比較検討

著者 野村佳代*¹, 大野勝雄*², 光畑律子*³, 渡邊久美*⁴, 犬飼昌子*⁵
狩山玲子*⁶, 千田好子*⁷

- *1 神戸大学医学部保健学科 講師
- *2 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 技術長
- *3 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 技術補佐員
- *4 岡山大学医学部保健学科 助手
- *5 元 岡山大学医学部保健学科 助手
- *6 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助手
- *7 元 岡山大学医学部保健学科 教授

はじめに

近年、人口の高齢化や在院期間の短縮化などから、医療依存度の高い在宅療養患者が増加し、在宅における医療的ケアが多く実施されている。

そのうち気管内吸引は、気道内の分泌物を除去し、肺合併症を予防するための重要な処置である。気管内吸引は、本来無菌状態である気道内に異物である気管内吸引カテーテル（以下、カテーテル）を挿入することから、無菌操作が要求される。そのためカテーテルは、滅菌されたものを単回使用することが推奨されている¹⁾。しかし臨床現場では、吸引を頻回に実施する場合、経済的負担や医療廃棄物の増加などの理由から、カテーテルの再使用は認めざるを得ないとしている^{2, 3)}。さらに在宅では、カテーテルの再使用に加え、長期間にわたる使用も報告⁴⁾されており、物的および人的問題から無菌操作を実施することは困難である。

しかし、在宅における気管内吸引マニュアルは、病院内における手順に準じて検討されている⁵⁾た

め、介護者の気管内吸引に関する感染対策は統一されていない。そこで我々は、感染対策指標の確立を目的に、在宅感染対策の実態調査を実施し、カテーテルの汚染状況を報告した⁶⁾。また在宅で使用されているカテーテルの材質の違いについて、走査型電子顕微鏡（scanning electron microscope：SEM）による可視的評価が可能であることをすでに示した⁷⁾。

今回は、SEMを用いてカテーテル素材別菌付着状態を観察し、その汚染状況とカテーテル管理方法について比較検討した。

材料と方法

◆使用済みカテーテル

気管内吸引が必要な在宅療養患者から、研究協力に同意を得て提供された、使用済みカテーテル37本（ポリ塩化ビニル製30本、ゴム製7本）を研究対象とした。

再使用した気管内吸引カテーテルの 走査型電子顕微鏡による汚染状況の比較検討



◆カテーテル付着生菌数の測定

カテーテルの先端10cmを滅菌済み鋏で1cmずつに切断し、滅菌生理食塩水5mL入りのスピッツに入れ、30秒間攪拌したものを菌液とした。菌液は10倍希釈法で希釈し、一般細菌用寒天培地に100 μ L接種し、35~37 $^{\circ}$ C、18時間培養後、発育したコロニーを数えた。

◆SEMでの観察

ポリ塩化ビニル製およびゴム製カテーテルの先端側孔から10cmの部分滅菌済み鋏で1cm分切断し、前固定液（リン酸緩衝液〔PBS〕中1%グルタルアルデヒド）に4 $^{\circ}$ C1時間浸漬後、PBS洗浄を4 $^{\circ}$ Cにて2回行った。さらに、後固定液（PBS中1%四酸化オスミニウム）に4 $^{\circ}$ C1時間浸漬後、再度PBS洗浄を4 $^{\circ}$ Cにて2回行った。その後エタノール脱水系列（50%、60%、70%、80%、90%）を4 $^{\circ}$ Cで15~20分間それぞれ1回ずつ、次に100%にて室温で15~20分間2回行い、自然乾燥した。脱水後、カテーテル断片の内側ないし外側を上にして試料台に貼り付け、白金パラジウムで蒸着した。試料はSEM（S570型、日立製作所）で観察した。

結果

◆ポリ塩化ビニル製カテーテル

ポリ塩化ビニル製カテーテルの内・外側の両面を観察した。カテーテル付着生菌数が最も多かった（ 2.5×10^4 cfu/100 μ L）カテーテル外側のSEM像が図1-Aである。球菌の分裂が確認され、周囲はバイオフィームと推測されるものがあった。このカテーテルは、使用時間2,880時間、イソジンに浸漬保管されていた。

カテーテル付着生菌数が2番目に多かった（ 2.0×10^4 cfu/100 μ L）カテーテルの外側（図1-B）には、連鎖桿菌が確認され、周囲はバイオフィームの形成が疑われた。このカテーテルは、使用時間24時間、エタノールに浸漬保管されていた。

カテーテル付着生菌が検出されなかったカテーテル内側（図1-C）には、球菌とともに典型的ともいえるバイオフィームが形成されていた。外側（図1-D）には菌の存在を認めなかったが、破損と思われる形状が確認された。このカテーテルは、使用時間72時間、グルコン酸クロルヘキシジン（CHG）に浸漬保管されていた。

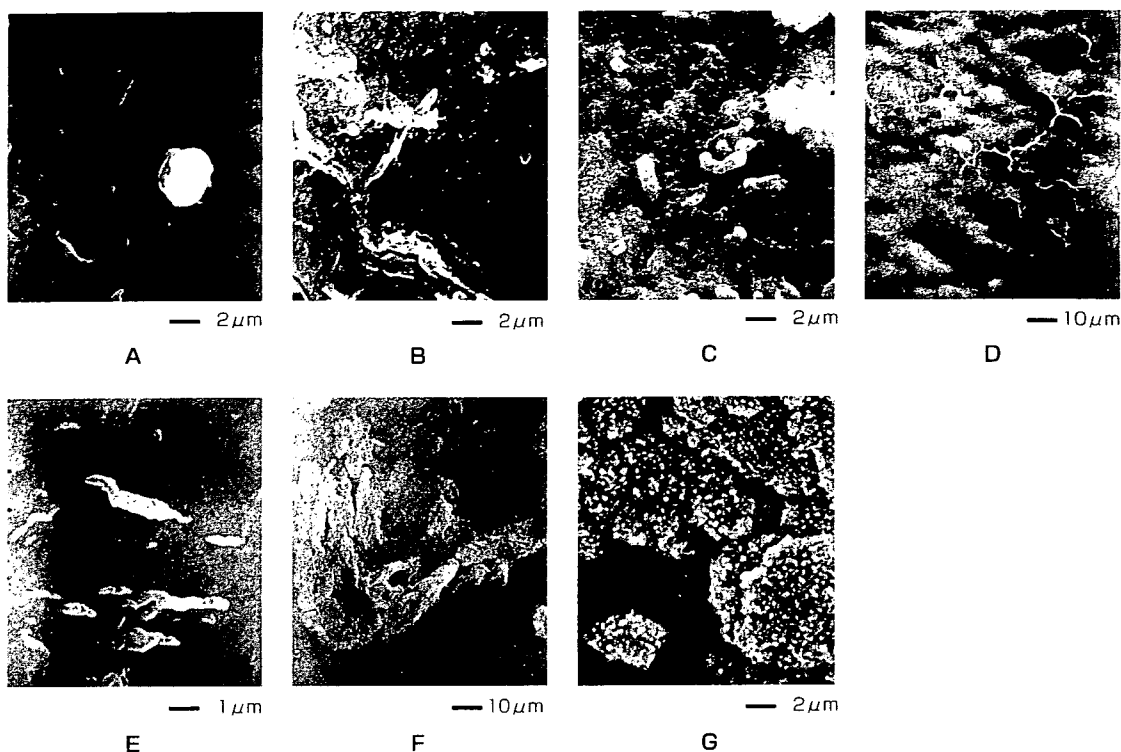
カテーテル付着生菌が検出されなかった別のカテーテル内側（図1-E）には、波状の菌が認められた。その形状から見て、マイコプラズマカレジオネラが推測されたが、このカテーテルを使用した者には肺炎の既往はなかった。カテーテル使用時間は9時間で、CHGに浸漬保管されていた。

中程度の生菌数（ 2.1×10^2 cfu/100 μ L）が検出されたカテーテル（図1-F, G）は、内・外側に部分的に固まった付着物を認めた。使用時間は91時間で、空容器に乾燥保管されていた。

◆ゴム製カテーテル

ゴム製カテーテルの内・外側の両面を観察した。カテーテル付着生菌数が最も多かった（ 8.6×10^6 cfu/100 μ L）カテーテルのSEM像が図2-A, Bである。内側は桿菌とバイオフィームが、外側は何層にもわたる付着物の存在が疑われた。このカテーテルは、使用時間720時間、水道水に浸漬保管されていた。

カテーテル付着生菌数が2番目に多かった（ 7.0×10^5 cfu/100 μ L）カテーテルのSEM像が、



- A: 生菌数が最多のカテーテル外側
 B: 生菌数が2番目に多かったカテーテル外側
 C: 生菌が検出されなかったカテーテル内側
 D: 生菌が検出されなかったカテーテル外側
 E: 生菌が検出されなかった別のカテーテル内側
 F: 中程度の生菌数が検出されたカテーテル内側
 G: 中程度の生菌数が検出されたカテーテル外側

図1 再使用したポリ塩化ビニル製カテーテルのSEM像

図2-C, Dで、内側には桿菌と思われる菌が確認できた。外側は分厚い付着物で覆われているように見えた。このカテーテルは、使用時間4,320時間、塩化ベンザルコニウムに浸漬保管されていた。

図2-Eは、中程度の生菌数 (4.2×10^2 cfu/100 μ L) が検出されたカテーテル外側のSEM像で、付着物で覆われているように見えた。カテーテルの使用時間は4時間で、CHGに浸漬保管されていた。

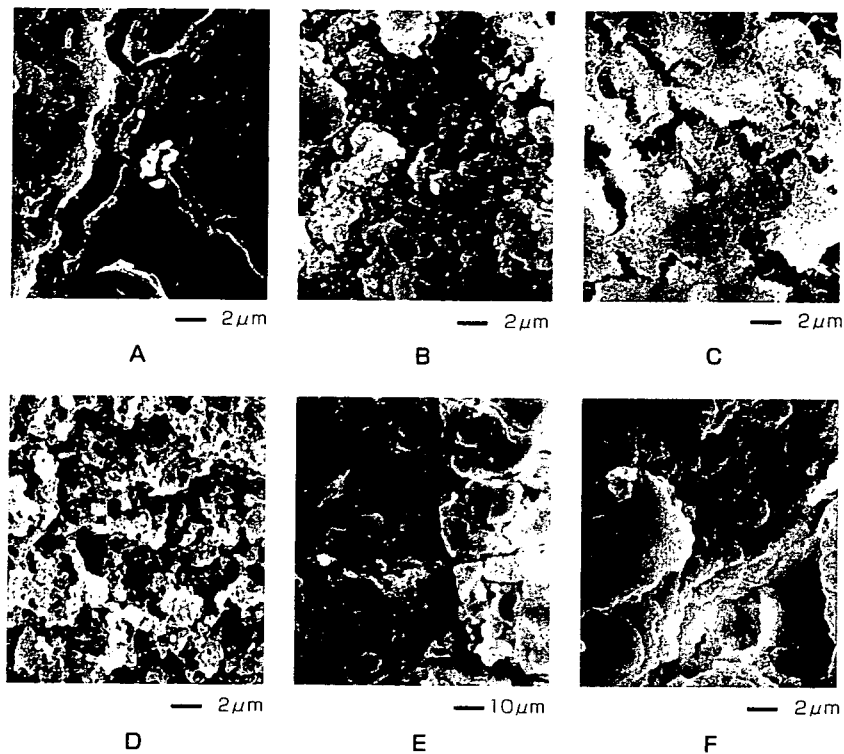
7本のゴム製カテーテルのうち、生菌が検出さ

れなかったカテーテルのSEM像が図2-Fで、内・外側ともに分厚い付着物で覆われているように見えた。カテーテルの使用時間は48時間、CHGに浸漬保管されていた。

■ 考 察

SEMによって、カテーテルは細菌以外の汚染もあることが確認できた。一般細菌用寒天培地では増殖しにくいマイコプラズマやレジオネラを疑う

再使用した気管内吸引カテーテルの 走査型電子顕微鏡による汚染状況の比較検討



- A：生菌数が最多のカテーテル内側
 B：生菌数が最多のカテーテル外側
 C：生菌数が2番目に多かったカテーテル内側
 D：生菌数が2番目に多かったカテーテル外側
 E：中程度の生菌数が検出されたカテーテル外側
 F：生菌が検出されなかったカテーテル外側

図2 再使用したゴム製カテーテルのSEM像

所見が認められ、生菌が検出されなくても、細菌汚染の可能性があることが示唆された。また我々がすでに報告したように⁶⁾、カテーテル付着菌として *Pseudomonas aeruginosa* などの *Pseudomonas* 属の菌種が多く同定されており、バイオフィルムの形成が強く疑われる所見もあった。

以上の成績から、在宅におけるカテーテル汚染状況の評価について、さらなる検討が必要と考える。ただし、SEM像による細菌は、その形状や

大きさから球菌・桿菌・その他の3分類しかできないという限界がある。

ポリ塩化ビニル製カテーテルとゴム製カテーテルでは、ゴム製カテーテルの生菌数が有意に多く検出された⁶⁾が、SEMによっても汚染状況が確認できた。ただし、ゴム製カテーテルの汚染状況は、未使用でも付着物で覆われているように見えるので評価は難しい⁷⁾が、生菌数やポリ塩化ビニル製の汚染状況との比較において、汚染度が大き

いことが明らかとなった。ゴム素材のカテーテル使用はできるだけ避けたいが、在宅では多く使用されている⁶⁾。これはゴム製品がポリ塩化ビニル製に比べ安価で、柔軟性があるためと考えられる。ゴムの柔軟性と塩化ビニル製の性状を持つ、連続使用が可能なカテーテルの製造が待たれる。

SEM像によるカテーテル汚染状況とその管理方法との関連について検討した。カテーテル使用時間については、連続4ヵ月使用したカテーテルのSEM像(図1-C)から、カテーテル汚染は使用時間に大きく影響すると予測された。しかし、9時間使用のカテーテル(図1-E)でもかなりの細菌汚染が認められることから、カテーテルの使用時間とその汚染状況の関連性は明らかにできなかった。カテーテルの保管は、1例(図1-F, G)のみが空の容器への乾燥保管であり、その他は浸漬保管であった。カテーテルの乾燥保管は、消毒薬浸漬保管と比べ細菌汚染には大差がなく、消毒薬費用も不要で、簡便な方法であるとされている⁹⁾。しかし、今回の検討では乾燥保管は1例のみであり、その有効性について言及することはできない。

カテーテル浸漬保管用消毒薬については、CHG使用で特殊な菌(図1-E)が確認された。また、イソジン液でもバイオフィルムを疑う所見が認められ(図1-A)、消毒薬の殺菌効果が低いことが推測された。一方、消毒薬の代わりに水道水にカテーテルを保管したもの(図2-A, B)は、カテーテルがゴム製で、使用時間6ヵ月間であったことから、カテーテル汚染と消毒薬との関連は言及できなかった。

カテーテル汚染要因として、気道分泌物吸引後のカテーテル洗浄方法がある。今回、洗浄水についての検討はしていないが、洗浄が不十分である

と有機物が消毒薬の殺菌効果を低下させ、細菌の増殖・バイオフィルム形成が起りやすくなる¹⁰⁾。

SEMによる可視的な評価によって、再使用カテーテルはさまざまな要因が複合的に影響しあって、汚染されていることが示唆された。そのため、カテーテルの汚染状況と管理方法との関連性については明らかにできなかった。

本研究は科学研究費補助金(基盤C、平成16~18年度、No.16592199)の助成を受けて行った。

文 献

- 1) 日本看護協会編。看護ケアと感染防止。日本看護協会看護業務基準集2003年。東京、日本看護協会出版会、2003、103-17。
- 2) 逢坂範子。見直しの実例①気管内吸引-吸引カテーテルの適正使用-。看護管理。10(6)、2000、446-50。
- 3) 尾家重治ほか。気管内吸引チューブの微生物汚染とその対策。日本環境感染学会誌。8(1)、1993、15-8。
- 4) 渡邊久美ほか。介護者による気管内吸引カテーテル管理の現状と課題。訪問看護と介護。10(8)、2005、666-73。
- 5) 小森由美子ほか。看護・在宅介護の現場における吸引カテーテルと消毒剤の取り扱いに関する指導マニュアルの検討。医療薬学。28(5)、2002、478-83。
- 6) 千田好子ほか。人工呼吸回路による在宅呼吸管理を必要とする患者の感染管理の実態と気管内吸引関連物品の細菌汚染に関する検討。岡山医学会雑誌。118、2006、33-40。
- 7) 野村佳代ほか。再使用した気管内吸引カテーテルの走査型電子顕微鏡による観察。INFECTION CONTROL。15(10)、2006、1040-5。
- 8) 井村和美ほか。気管内吸引カテーテルのsingle useの有効性の検討。環境感染。20、2005、160。
- 9) 小長谷百恵ほか。在宅における気管内吸引チューブの管理方法について。環境感染。20、2005、161。
- 10) 土井まつ子ほか。頻回に使用する気管内吸引カテーテルの細菌学的検討。愛知医科大学看護学部紀要。4、2005、1-7。
- 11) 大井睦美ほか。気管内吸引カテーテルの通し水についての検討。環境感染。19、2004、171。

Case Report

Appearance of Multidrug-Resistant Opportunistic Bacteria on the Gingiva During Leukemia Treatment

Yoshihiko Soga,*† Takashi Saito,† Fusanori Nishimura,§ Fumihiko Ishimaru,|| Junji Mineshima,* Fumi Mineshima,* Hirokazu Takaya,¶ Hideaki Sato,# Chieko Kudo,*† Susumu Kokeguchi,** Nobuharu Fujii,‡ Mitsune Tanimoto,‡ and Shogo Takashiba*

Background: Dentists generally recognize the importance of periodontal treatment in patients with leukemia, with the most attention paid to preventing the development of odontogenic infection. For physicians, the worst type of infection is one caused by multidrug-resistant bacteria. Here, we report a patient with an abnormal increase in multidrug-resistant opportunistic bacteria in the gingiva during hematopoietic cell transplantation (HCT).

Methods: A 53-year-old woman receiving HCT for leukemia had an insufficient blood cell count for invasive periodontal treatment before HCT. Even brushing caused difficulties with hemostasis. Therefore, frequent pocket irrigation and local minocycline administration were performed.

Results: The multidrug-resistant opportunistic bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* was detected first in phlegm 2 days before HCT, and it was detected in a gingival smear and a blood sample 7 and 11 days after HCT, respectively. The patient developed sepsis on day 11 and died 14 days after HCT. Frequent irrigation and local antibiotic application were ineffective against *S. maltophilia* on the gingiva. Inflammatory gingiva without scaling and root planing showed bleeding tendency, and this interfered with the eradication of this bacterium.

Conclusions: The gingiva in patients undergoing leukemia treatment acts as sites of proliferation and reservoirs for multidrug-resistant opportunistic bacteria. Severe systemic infection by multidrug-resistant bacteria in such patients with leukemia also may involve the gingiva. To prevent abnormal increases in such bacteria on the gingiva, scaling and/or root planing before chemotherapy, which reduces bleeding on brushing during the neutropenic period caused by chemotherapy, may contribute to infection control in such patients, although it was impossible in this case. J Periodontol 2008;79:181-186.

KEY WORDS

Bacteria; drug resistance; gingiva; leukemia; opportunistic infections.

* Department of Pathophysiology – Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan.

† National Sanatorium Oku-Komyoen, Setouchi, Okayama, Japan.

‡ Department of Hematology, Oncology and Respiratory Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

§ Currently, Department of Dental Science for Health Promotion, Division of Cervico-Gnathostomatology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima, Japan; previously, Department of Pathophysiology – Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

|| Currently, Okayama Red Cross Blood Center, Okayama, Japan; previously, Department of Hematology, Oncology and Respiratory Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

¶ National Sanatorium Kuryu-Rakusenon, Kusatsu, Gunma, Japan; previously, Department of Pathophysiology – Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

Private practice, Fukuyama, Hiroshima, Japan; previously, Department of Pathophysiology – Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

** Department of Global Health and Environmental Sciences – Oral Microbiology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous clonal disorder of hematopoietic progenitor cells and is the most common type of malignant myeloid disorder in adults.¹ Treatment for AML consists of induction chemotherapy followed by a number of cycles of consolidation chemotherapy. The goal of induction chemotherapy is to achieve complete remission by eliminating leukemic cells from the bone marrow, whereas consolidation chemotherapy is necessary to prevent relapse after remission. Hematopoietic cell transplantation (HCT) can be used as postremission therapy.²

Oral and systemic infections arising from the oral cavity are significant problems in patients with cancer who are treated with intensive chemotherapy regimens, including HCT.³ Preexisting periodontal infections may induce fever, and microorganisms may spread systemically in patients with hematological malignancy during chemotherapy.⁴⁻⁷ From the viewpoint of physicians involved in the treatment of patients with leukemia, infection by multidrug-resistant bacteria is the worst type of infection.

Here, we report the appearance of multidrug-resistant opportunistic bacteria on the gingiva in a patient receiving HCT. This case showed that the gingiva in patients undergoing leukemia treatment acts as sites of proliferation and as reservoirs for multidrug-resistant opportunistic bacteria.

CASE DESCRIPTION AND RESULTS

Patient

The patient was a 53-year-old Japanese woman who developed AML at 51 years of age. Despite repeated consolidation therapy, her leukemia relapsed, and she was referred to the Department of Hematology, Okayama University Hospital, Okayama, Japan, for treatment. Umbilical cord HCT was planned, and she was referred by her physician to the Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital, for oral examination and treatment, if necessary, 40 days before HCT. Her medical history was not remarkable except for the leukemia.

Clinical Oral Findings on First Oral Examination

The first oral examination was performed 40 days before HCT. The patient's blood cell counts were: white blood cells (WBCs) = 4,900/ μ l (1.5% neutrophils); platelets = 29,000/ μ l; and C-reactive protein (CRP) = 0.4 mg/dl. The gingival appearance is shown in Figure 1. Although attachment loss was not remarkable, redness, hypertrophy, and deep pockets with probing depths ranging from 4 to 6 mm were observed around the interdental gingiva. Radiographs were not available as she could not leave the biologic clean room because of her severely immunocompromised condition. However, the possibility of existing odontogenic

infections other than periodontitis was very low because she had no third molars and no visible dental caries. In addition, tooth restorations in this patient were few and limited to the occlusal fissure.

Oral Diagnosis and Treatment Planning

Based on the clinical findings, a diagnosis of mild chronic periodontitis was made. However, gingival hypertrophy associated with leukemic cell infiltration caused deep periodontal pockets. Therefore, the patient was judged to be at high risk for developing systemic infection from periodontitis.

Total-body irradiation and high-dose chemotherapy were planned from days -7 to -5 and from days -4 to -3 prior to HCT, respectively. These two therapies generally are referred to as the conditioning regimen for HCT. This therapy causes reduction of the normal WBC count to \sim 0/ μ l along with that of leukemic cells, resulting in an extremely immunocompromised condition. Her severe neutropenia was estimated to continue for \sim 4 weeks until engraftment.

Scaling and/or pocket curettage could not be performed prior to HCT because the patient's neutropenia and thrombocytopenia were severe. Even brushing of the inflamed gingiva was difficult because of the deficiency of hemostasis. To reduce the bacterial counts in the periodontal pocket without invasive procedures, pocket irrigation with 0.2% povidone iodine was performed every day, and 2% minocycline slow-releasing ointment^{††} was applied once a week. Bacterial counts in the periodontal pockets in the 13 bucco-distal regions and 31 bucco-mesial regions were monitored. The methods used for the isolation and detection of total bacteria and three major periodontal bacteria, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromonas gingivalis*, were described previously.⁸

Clinical Course

Gingival appearances during the observation periods are shown in Figure 2. Changes in the patient's CRP, WBC, and neutrophil counts are shown in Figure 3.

Before the conditioning regimen for HCT, WBC counts increased, and gingival hypertrophy around the interdental area became severe. Hypertrophic gingiva almost covered the tooth crown and caused deep pockets. A high temperature $>39.0^{\circ}\text{C}$ continued from 14 days before HCT. The CRP value also was elevated to 18.9 mg/dl. No infection other than periodontitis was found. Frequent pocket irrigation and application of minocycline ointment to the periodontal pockets were continued. Systemic antibiotic treatment also was performed as summarized at the end of this section. However, the CRP value showed a marked reduction from 18.9 to 3.2 mg/dl as a result of the high-dose

†† Periocline, Sunstar, Osaka, Japan.

Figure 1.
Gingival appearance at first oral examination (40 days before HCT).

Figure 2.
Changes in gingival appearance before HCT. **A)** Day -40, at first oral examination. **B)** Day -15, before total-body irradiation. **C)** Day 0, the day of HCT.

chemotherapy and total-body irradiation, not the antibiotics. Reducing WBCs along with the number of leukemic cells led to the disappearance of gingival hypertrophy (Fig. 2C).

After total-body irradiation at -4 days before HCT, the CRP value was elevated again (Fig. 3), although the patient's leukemic cells had disappeared. From this stage, the WBC count remained $\sim 0/\mu\text{l}$. The CRP value became very high, ranging from 13.1 to 21.8 mg/dl. A high temperature $>39.0^\circ\text{C}$ continued. Bacterial counts in the periodontal pockets showed no remarkable increase throughout the period of the conditioning regimen and HCT (Fig. 4).

Seven days after HCT, white smears appeared on the gingiva around the tooth margins despite frequent irrigation (Fig. 5). These white smears could be wiped off with cotton, but inflammatory gingiva without scaling or root planing showed a bleeding tendency, and this interfered with the eradication of such smears. Platelet count remained low at $5,000 \sim 10,000/\mu\text{l}$. Detection of bacteria by culture revealed that the white smears consisted of opportunistic bacteria, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Enterococcus faecalis*, which had been detected in phlegm 2 days before HCT. Eleven days after HCT, sepsis caused by *S. maltophilia* and *Pseudomonas aeruginosa* occurred, and the patient died 14 days after HCT. All of these bacteria showed high levels of resistance to many antibiotics. Among the bacteria detected, *S. maltophilia* was common to phlegm, gingiva, and blood samples, and the antibiotic sensitivity patterns were almost the same in each isolate (Table 1).

The antibiotics used in this patient were as follows: days -16 to -8 = meropenem; days -7 to +1: cefepime = days +2 to +12 = biapenem; days +8 and +9 = gentamicin; and days +9 to +14 = clindamycin.

DISCUSSION

No systemic infection other than periodontitis was discovered in this patient before the conditioning regimen for HCT. We attempted to perform continuous irrigation without invasive procedures because of her severe neutropenia and thrombocytopenia. However, the main cause of the high fever and CRP seemed to be the leukemia itself, because high-dose chemotherapy and total-body irradiation markedly reduced CRP.

After total-body irradiation, the CRP value was elevated again, although her leukemic cells had disappeared. Therefore, in this case, infection was strongly suspected. Because of her high fever and CRP, many types of antibiotics were used, and this could have led to mi-

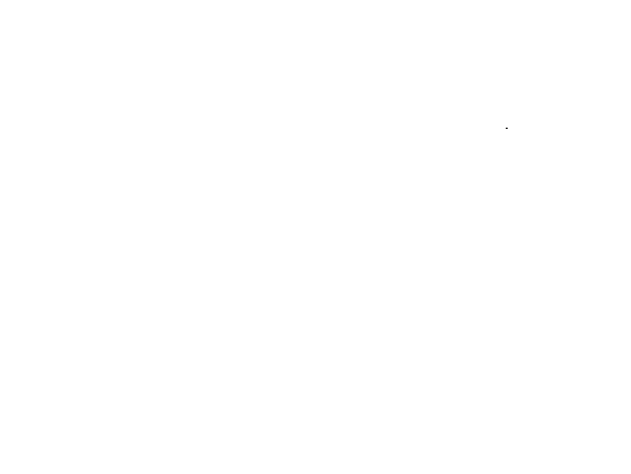


Figure 3. Changes in CRP value, WBC, and neutrophil counts. TBI = total-body irradiation; HDC = high-dose chemotherapy.

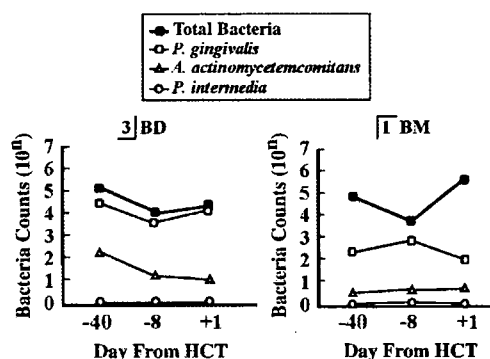


Figure 4. Changes in bacterial counts in the periodontal pockets. Bacterial counts of the periodontal pockets at the 13 bucco-distal (BD) and 31 bucco-mesial (BM) regions were monitored on days -40, -8, and +1 relative to HCT. Throughout the period of the conditioning regimen and HCT, periodontal bacteria showed no remarkable increase in number. Symbols around 3 and 1 show the location of teeth.

crobial substitution. The multidrug-resistant opportunistic bacterium *S. maltophilia* was detected first in phlegm 2 days before HCT, and was detected in a smear on the gingiva and in a blood sample 7 and 11 days after HCT, respectively. We speculated that all of these bacteria were of the same origin because the antibiotic sensitivity patterns of the three isolates were very similar. *S. maltophilia* might reach the gingiva from the respiratory tract. The visible growth of a white smear of *S. maltophilia* on the patient's gingiva could be wiped off with cotton, but it caused difficulties in hemostasis. Frequent irrigation and local application of antibiotics were ineffective against *S. maltophilia*, probably because of the antibiotic resistance of the biofilm, although major periodontal

bacteria were maintained at clinically acceptable levels and were not systemically causal. It was reported that allogenic bone marrow transplantation is a significant risk factor for *S. maltophilia* with antibiotic-resistant bacteremia.⁹

In this case, inflammatory gingiva without scaling or root planing interfered with keeping the gingiva clean by brushing or wiping off with cotton throughout the HCT period, even though white smears consisting of multidrug-resistant bacteria appeared, because the bleeding tendency could cause the risk for bacteremia and difficulty in hemostasis. Scaling and root planing before chemotherapy can reduce gingival inflammation and enable removal of the biofilm, which may consist of multidrug-resistant bacteria, by brushing or wiping off with cotton during the neutropenic and thrombocytopenic period. A case was reported in which successful periodontal treatment was performed to maintain good gingival condition without any bleeding, even though the platelet count was very low (~5,000/ μ l).¹⁰ Although scaling and root planing

could not be performed in this case, many patients have WBC and platelet counts sufficient to allow such periodontal treatments before chemotherapy.

Dentists generally recognize the importance of periodontal treatment in patients with hematological malignancy, and most attention is paid to prevention of the development of odontogenic infection itself during the neutropenic period. Conversely, for patients with neutropenia undergoing HCT, the worst type of life-threatening bacterial infection is that by multidrug-resistant bacteria. The patient reported here showed inflammatory gingiva without scaling or root planing before chemotherapy and bleeding tendency, and this interfered with the eradication of multidrug-resistant opportunistic bacteria that may appear during the severe neutropenic period caused by chemotherapy. It is not clear whether this unusual infection consisting of such bacteria was the cause of death in this case or was confined to the oral cavity as a reservoir. However, there is concern regarding, the direct and/or indirect influences of these bacteria, e.g., aspiration pneumonia or focal infection, on the patient's life and death. Therefore, an effort should be made to prevent abnormal increases in the number of multidrug-resistant bacteria on the gingiva. Scaling and root planing before chemotherapy may reduce inflammation of the gingiva, which may reduce the bleeding caused by brushing, even in the neutropenic period. Prevention of abnormal increases in multidrug-resistant bacteria on the gingiva by scaling and/or root planing before chemotherapy, which would allow intensive brushing during the neutropenic period, may contribute to infection control in such patients.

Figure 3.

White smears appeared on the gingiva around the tooth margins 7 days after HCT. Detection of bacteria by culture revealed that the white smear consisted of *S. maltophilia* and *E. faecalis* with high levels of resistance to many antibiotics. R = right; L = left.

Table 1.

Sensitivity of *S. maltophilia* (detected in phlegm, gingival smear, and blood samples) to Major Antibiotics

Day of Detection	Sample	MIC (μ g/ml)					
		Piperacillin (penicillin)	Cefozopran (cephem)	Amikacin (aminoglycoside)	Minocycline (tetracycline)	Ciprofloxacin (quinolon)	Imipenem (penem)
-2	Phlegm	>16	16	16	2	>8	>16
+7	Gingiva	>16	16	4	2	>8	>16
+11	Blood	>16	16	8	2	>8	>16

CONCLUSIONS

The gingiva in patients undergoing leukemia treatment acts as sites of proliferation and as reservoirs for multidrug-resistant opportunistic bacteria. Severe systemic infection by multidrug-resistant bacteria in such patients also may involve the gingiva.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a Grant-in-Aid for Encouragement of Scientists (18925018) from the Japan Society for the Promotion of Science; a Grant-in-Aid for Cancer Research (15-23) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; and a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (H19-medical-treatment-007). The authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukemia. *Lancet* 2006;368:1894-1907.
2. Greer JP, Baer MR, Kinney MC. Acute myeloid leukemia in adults. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004:2097-2142.
3. Heimdahl A. Prevention and management of oral infections in cancer patients. *Support Care Cancer* 1999;7: 224-228.
4. Greenberg MS, Cohen SG, McKittrick JC, Cassileth PA. The oral flora as a source of septicemia in patients with acute leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53:32-36.
5. Laine PO, Lindqvist JC, Pyrhonen SO, Strand-Pettinen IM, Teerenhovi LM, Meurman JH. Oral infection as a reason for febrile episodes in lymphoma patients receiving cytostatic drugs. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B:103-107.
6. Overholser CD, Peterson DE, Williams LT, Schimpff SC. Periodontal infection in patients with acute non-lymphocyte leukemia. Prevalence of acute exacerbations. *Arch Intern Med* 1982;142:551-554.
7. Peterson DE, Overholser CD. Increased morbidity associated with oral infection in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;51:390-393.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451-458.
9. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39: 81-86.
10. Oyaizu K, Mineshiba F, Mineshiba J, et al. Periodontal treatment in severe aplastic anemia. *J Periodontol* 2005;76:1211-1216.

Correspondence: Dr. Shogo Takashiba, Department of Pathophysiology – Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8525, Japan. Fax: 81-86-235-6679; e-mail: stakashi@cc.okayama-u.ac.jp.

Submitted April 13, 2007; accepted for publication June 4, 2007.