

- CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3221–3229.
19. Qi, F., P. Chen, and P. W. Caufield. 2001. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:15–21.
 20. Sahl, H. G., and G. Bierbaum. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:41–79.
 21. van der Ploeg, J. R. 2005. Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. *J. Bacteriol.* **187**:3980–3989.
 22. Wang, B. Y., and H. K. Kuramitsu. 2005. Interaction between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:354–362.
 23. Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, and J. S. Mattick. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**:1487.
 24. Yonezawa, H., and H. K. Kuramitsu. 2005. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:541–548.
 25. Yoshida, A., and H. K. Kuramitsu. 2002. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6283–6291.

Original Article

Impact of routine oral care on opportunistic pathogens in the institutionalized elderly

Koyu Kokubu¹, Hidenobu Senpuku², Akio Tada², Yasuhiko Saotome¹ and Hiroshi Uematsu¹

1) Department of Gerodontology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

2) Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

Routine oral hygiene is important for the control of opportunistic pathogens in the oral cavity of institutionalized elderly individuals. We evaluated the effects of routine oral care on opportunistic pathogens at various time points after admission to a nursing home. Twenty-five elderly subjects living in the nursing home (mean age: 86.0 ± 10.4 years) participated in the study. Caregivers and dental hygienists cleaned the teeth, dentures, tongue, and mucosa after each meal using both routine and professional oral care techniques. Opportunistic pathogens were collected from the teeth, tongue, and mucosal surfaces using a cotton swab; and the species of microbes were determined and the numbers were counted following cultivation on selective agar. Regular oral care including professional oral care was found to be effective for reducing infections by many kinds of opportunistic pathogens on the teeth surfaces and the oral environment without food residue during a long-term study (6 months). Further, this care after 1 month significantly reduced infections by opportunistic pathogens on mucosal surfaces in subjects without dentures; however, this was not observed in those with dentures. Our data shows the importance of regular oral care in cleaning hard and soft surfaces of the oral cavity improves the oral health of the institutionalized elderly.

Key words: oral biofilm, denture, oral care, opportunistic pathogens, institutionalized elderly

Introduction

In Japan, the number of elderly people is steadily increasing where those over the age of 65 will account for approximately 25% of the population by 2025¹. Accordingly, the number of bedridden elderly requiring systemic care in residential and nursing homes will also increase. Reports show institutionalized elderly individuals have poorer oral health than those who live independently at home^{1,3}. Further, the oral cavity is thought to be a potential reservoir of opportunistic pathogens that are risk factors for pneumonia in the elderly^{4,6}. Further, studies show a higher prevalence of nosocomial and Gram-negative enteric bacilli pathogens in institutionalized elderly patients with severe pneumonia^{7,8}. El-Solh *et al.* reported respiratory pathogens colonizing dental plaque were implicated in the infections of the lower respiratory tract in institutionalized elderly subjects⁹.

There are possible links with poor hygiene and host-defense problems to an increased incidence of pneumonia in institutionalized elderly patients¹⁰⁻¹². Therefore, oral hygiene is considered to be important to control opportunistic pathogens on teeth and mucosal surfaces; and some studies indicate oral hygiene for hospitalized elderly patients reduces the risk of nosocomial pneumonia^{3,13,14}. Thus, regular dental care may be effective in reducing the numbers of dental and respiratory bacteria for the elderly residents in long-term care facilities. Although the effects of oral care

Corresponding Author: Hiroshi Uematsu
Department of Gerodontology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan
TEL: 03-5803-5559
E-mail: matsuo.gerd@tmd.ac.jp
Received July 27, 2007; Accepted January 9, 2008

have been reported, few studies have surveyed the different opportunistic pathogens in institutionalized elderly subjects between, before and after receiving regular dental care provided by care-givers and dental hygienists. In this study, we isolated opportunistic pathogens from the teeth, tongue, and mucosal surfaces from elderly subjects requiring systemic care at various time points before and after regular and professional oral care. The purpose of this study was to evaluate the effects of oral care on opportunistic pathogen populations in institutional elderly people.

Materials and Methods

Subjects

Beginning 2 weeks after entering a Toshima-ward, Tokyo nursing home, 25 residents (mean age: 86.0 ± 10.4 years; 6 males, 19 females) who required long-term nursing care participated in this study. This nursing home was new (established May, 2004) with a capacity of 62. The study was conducted from October 2004 to May 2005 where the subjects were randomly selected from the residents of the same floor using a random-numbers table and held blind from the investigators. The subjects were in two groups; those requiring little care, *i.e.* not bedridden or confined to bed ($n = 8$); and those requiring intensive care, *i.e.* confined to their bed ($n = 17$). Prior consent was obtained from all subjects. The study was approved by the Ethics Committee of the Tokyo Medical and Dental University and performed according to the rules of the Helsinki Declaration. Dental examinations to determine the presence of dental caries, periodontal pocket depths, dental calculus, remaining food residues, and other typical oral conditions were performed using artificial white light by trained dentists before the study and during routine professional oral care. Four dentists assessed the subject's dental and periodontal condition using six measurements points for each tooth: mesiobuccal, buccal, distobuccal mesiolingual, lingual, and distolingual.

Oral care

At the initial examination, all patients had a routine dental and medical examination. Oral care techniques by dental hygienists and care givers were standardized before beginning oral care. For daily oral care, subjects who were able used the sink facilities in their rooms and performed standard oral hygiene three times a day by themselves; and cleaning status was confirmed by the

care givers examining the oral cavity. Whereas the other subjects were performed by care givers three times a day and assisted in oral cleaning with tooth brushing, brushing of denture surfaces and oral rinsing with tap water. The patients cleaned their teeth, dentures, tongue, and mucosa surfaces after each meal using routine oral care techniques. Further, for 20 minutes twice per month, dental hygienists provided professional care such as removing oral calculus with a scaler, dental brushing of teeth surfaces, mucosal cleaning with a sponge brush, denture cleaning, and oral washing with 0.5% povidone-iodine solution (Isodine-Gargle, Meiji seika, Tokyo, Japan) in addition to the daily oral care. The routine oral care including professional care was performed for 6 months. Daily oral care without professional care was performed from entering the institution to the first sampling. No antibiotic therapy was administered during the 2 weeks before the start of this study and during the 6 month study period; and none of the subjects suffered from severe infections or systemic diseases. There was no information about antibiotic therapy for the subjects before entering the institution. The percentage of subjects who retained their own teeth was 36% (9/25). None of the subjects dropped-out of the study.

Bacterial sampling

Supragingival plaque samples were collected from the posteroanterior buccal surface of the upper right second premolar, the buccal surfaces of the upper right second premolar and first molar using a cotton swab (Seedswab No. 1, Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo); and transferred to 1 ml of reduced transport fluid (0.4% agar, 0.15% thioglycollate/phosphate-buffered saline) in sterile bottles. For edentulous subjects who used complete dentures ($n = 12$), the samples were collected from the same regions of the upper right second premolar and first molar of the complete dentures. For edentulous subjects not using dentures, plaque samples were not collected. Subjects using partial denture ($n = 2$) and not having any of the above mentioned teeth were sampled from the opposite side or other remaining teeth. Samples were also collected by swabbing five times from the center of the tongue and right buccal surface of the oral mucosa. All samples were taken before professional care by a dental hygienist. After placement in transport fluid, the samples were immediately transported to the Biomedical Laboratory (BML, Tokyo, Japan) for analysis to detect opportunistic pathogenic bacteria.

Identification of bacteria and fungi

The isolated bacteria and fungi from the plaque, the tongue, and mucosal surfaces were identified using culture procedures¹⁵. The samples were pour plated on chocolate agar, blood agar, OPA staphylococcus, and Drigalski agar plates (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd., Tokyo, Japan); and were incubated in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C for 24-48 hours. Representative colonies from each plate were isolated and analyzed using Gram stain, hemolysis, and oxidase reactions¹⁶. The colonies were suspended in 1 ml 0.5% saline; gently shaken; and tested using microbial identification kits (VITEK; BioMerieux Vitek Japan, Tokyo, Japan)¹⁶. The bacteria and fungi detected in the samples are shown in Table 1.

Statistical procedures

All data were analyzed using the Statistical Package for Social Science (SPSS) version 11.5. The proportion of elderly subjects in the two groups was compared using the Chi-square and Wilcoxon signed-rank tests for equal and unequal variations. A *p*-value of less than 0.05 was considered to be significant.

Results

Samples were not taken from the teeth, tongue and mucosal surfaces of two elderly subjects respectively at 4 and 6 months after the beginning of oral care owing to poor health. One month after starting oral care, the numbers of opportunistic pathogens on the teeth, tongue, and oral mucosal surfaces decreased in 6 of 21 (28.6%), 11 of 25 (44.0%), and 10 of 25 (40.0%) of the subjects, respectively, in comparison with their numbers

at the beginning of the study (Fig. 1). The proportion of subjects with decreasing opportunistic pathogens on teeth surfaces was significant at 4 (12/19, 63.2%, *p* = 0.027) and 6 (13/19, 68.4%, *p* = 0.011) months as compared to after 1 month (Fig. 1). In contrast, the proportion of subjects with decreased numbers (13/23, 56.5%) on the mucosa surfaces after 4 months were greater but were not significantly higher than at 1 month (10/25, 40.0%) after the beginning of oral care (Fig. 1). The proportion of subjects with decreasing numbers on the tongue after 4 months (6/23, 26.1%) was fewer and those after 6 months (13/23, 56.5%) increased as compared to those after 1 month (11/25, 44.0%); but none were significantly different. *Candida albicans* tended to remain on all surface areas at varying sampling times after professional care but other opportunistic pathogens did not.

The infection or accumulation of multiple species of opportunistic pathogens is a risk factor for respiratory tract infections in institutionalized elderly subjects. Therefore, detection of opportunistic pathogens was performed using a qualitative analysis to isolate multiple species. The proportion of elderly subjects where more than four species and strains of opportunistic pathogens were isolated was 10/21 (47.6%), 11/25 (44.0%) or 11/25 (44.0%) on the teeth, tongue and mucosal surfaces, respectively, before the beginning of professional care. To evaluate the effects of oral care in the elderly subjects, the proportion of subjects with

Table 1. Lists of species and strains of opportunistic pathogens detected on tooth, tongue and oral mucosa

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Chryseobacterium</i> sp.
<i>Candida albicans</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.
<i>Candida glabrata</i>	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Citrobacter koseri</i>	β- <i>Streptococcus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
MSSA (methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	

The strains and species of opportunistic pathogens were counted in each sample.

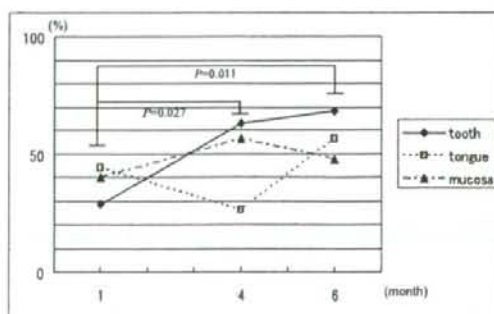


Fig. 1. The effects of routine oral care on the numbers of opportunistic pathogens compared to the numbers on initial examination. The number of subjects with decreasing numbers of opportunistic pathogens on teeth (*n* = 21, 19, and 19), tongue (*n* = 25, 23, and 23), and oral mucosa (*n* = 25, 23, and 23) surfaces with 1, 4, and 6 months of treatment respectively are shown. Numbers of opportunistic pathogens were 3.2 ± 1.5 , 3.6 ± 1.0 and 3.3 ± 1.2 for teeth, tongue, and oral mucosal surfaces, respectively, compared to prior to dental care. Asterisks denote significant difference in the chi-square test (*p* < 0.05, 1 month versus 4 or 6 months for each sample).

more than four species and strains of opportunistic pathogens was employed as an indicator. On teeth surfaces the numbers significantly decreased after 4 (2/19; 10.5%, $p = 0.012$) and 6 months (1/19; 5.3%, $p = 0.003$) in comparison to before the beginning of professional care (Fig. 2). On mucosal surfaces the opportunistic pathogens decreased after 4 and 6 months (3/23; 13.0% and 4/23; 17.4%) but not significantly. And there were no significant differences for the tongue surface. The comparison was confirmed using the mean \pm SD of opportunistic pathogens numbers as analyzed using the Wilcoxon signed-rank test (see below) on the teeth surfaces. The opportunistic pathogen numbers (2.4 ± 0.8) at 6 months after professional oral care was significantly lower than before the start of professional oral care (3.2 ± 1.5) on the teeth surfaces ($p = 0.028$). However, there were no significant differences in the other comparisons. Therefore, long-term professional oral care is significant to effectively decrease opportunistic pathogen numbers on teeth surfaces in comparison to short-term professional oral care.

The proportion of elderly subjects having decreased numbers of opportunistic pathogens on mucosal surfaces was significantly lower in patients with dentures (2/13, 15.4%) than in those without dentures (8/12, 66.7%) at 1 month ($p = 0.013$) but not at 4 and 6 months after the beginning of oral care (Fig. 3C). However, there were no significant differences for the teeth and tongue surfaces between subjects with and without dentures at various time points (Fig. 3A and B). The number of subjects with decreasing num-

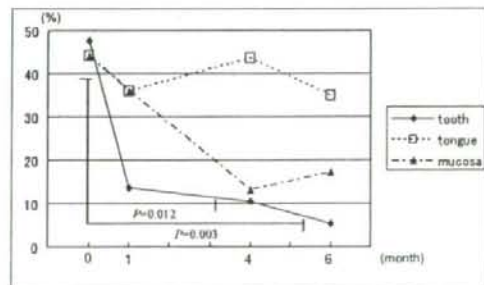


Fig. 2. The effects of routine oral care on the reduction of more than four types of opportunistic pathogens.

The number of subjects with more than four species and strains of opportunistic pathogens detected on the teeth, tongue, and oral mucosal surfaces at 0, 1, 4, and 6 months are shown. Asterisks denote significant difference in the chi-square test ($p < 0.05$, 0 month versus 1, 4 or 6 months for each sample).

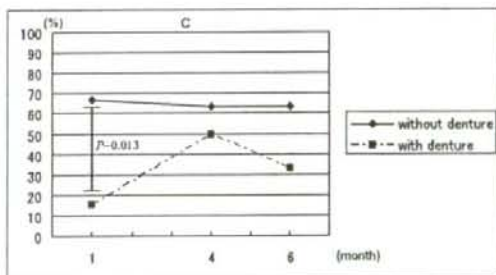
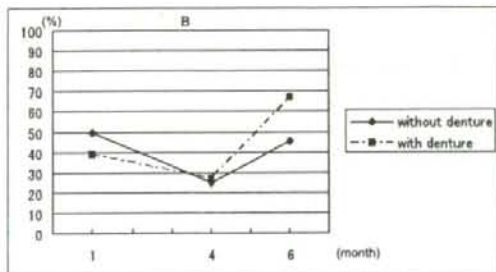
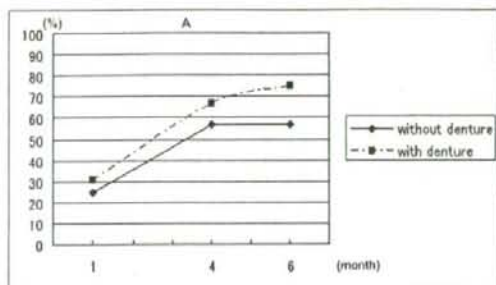


Fig. 3. The effects of routine oral care in subjects with and without dentures.

The number of subjects with decreasing numbers of opportunistic pathogens on the teeth (A), tongue (B), and mucosal (C) surfaces with and without dentures at 1, 4, and 6 months are shown. The number of subjects with dentures were 13, 12 and 12 for teeth, 13, 11 and 12 for the tongue, and 13, 12 and 12 for mucosa at 1, 4 and 6 months, respectively, after beginning professional care. The numbers of opportunistic pathogens were 2.7 ± 1.5 and 3.8 ± 1.3 for teeth, 3.7 ± 0.9 and 3.5 ± 1.3 for the tongue, and 3.1 ± 0.9 and 3.4 ± 1.1 on oral mucosal surfaces of elderly subjects with and without dentures, respectively, before the beginning of the study. Asterisks denote significant difference in the chi-square test ($p < 0.05$, with dentures vs. without dentures at 1, 4 or 6 months for each sample).

bers of opportunistic pathogens in elderly subjects with food residue (2/7, 28.6%) was significantly lower than those in subjects without food residue (11/12, 91.7%) on the teeth surfaces at 6 months ($p = 0.010$) (Fig. 4A). However, there were no significant differences among the patients with and without food residues on the tongue and mucosa at each sampling period after the beginning of oral care (Fig. 4B, C). Moreover, there were no significant differences between the two groups (non-bedridden and bedridden) in all data (data not shown) and among other dental and periodontal parameters.

Discussion

We investigated the effects of routine oral hygiene using professional care in institutional elderly subjects determining the numbers of opportunistic pathogens in samples taken from the teeth, tongue, and mucosal surfaces. Our data show routine oral hygiene with professional care was effective in reducing infections by a number of different opportunistic pathogens on teeth surfaces when food residues were removed from patients during long-term care. In addition, short-term treatment of 1 month showed a significant reduction of opportunistic pathogens on the mucosal surfaces between elderly subjects with and without dentures. Dentures may be reservoirs of opportunistic pathogens as well as the teeth surfaces^{17,18}; and may be a risk factor for opportunistic infection by many kinds of microorganisms in the institutionalized elderly. Therefore, dentures may disturb the effects of oral care on opportunistic pathogen infections in the short-term (1 month) on the oral mucosa. Consequently, long-term (4 and 6 months) oral care is necessary for decreasing the opportunistic pathogens in oral mucosa of elderly individuals with dentures.

It is important to consider the influence of oral health on elderly subjects living communally in the same institution, as well as communication between caregivers and those subjects. Accumulating evidence suggests community and health-care associated infections have a unique epidemiology; and the pathogens involved and outcomes may be related with nosocomial processes¹⁹⁻²¹. Further, transfers of microorganisms between the elderly or from caregivers and dental hygienists operating in the facility may have an influence on opportunistic infections in the oral cavity. Therefore, it may be possible that community- and care- associated infections were decreased or

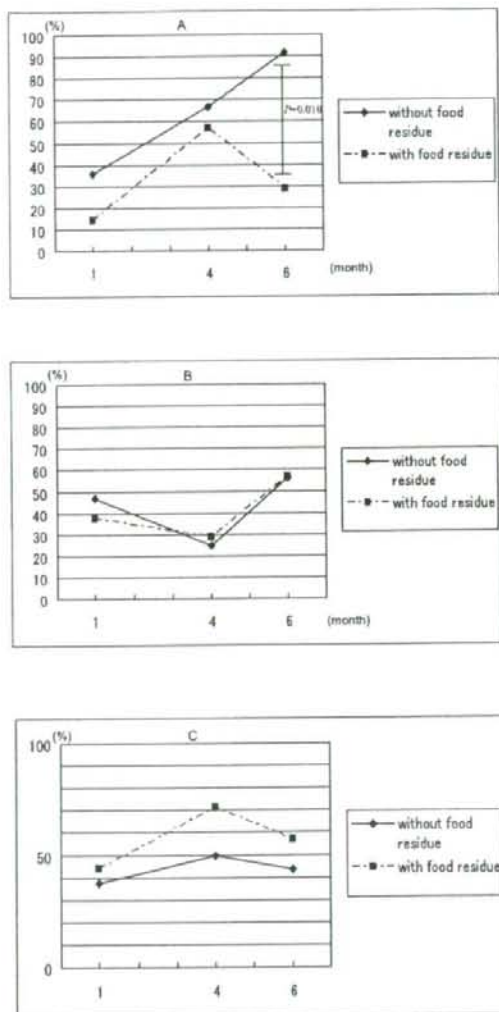


Fig. 4. The effects of routine oral care for subjects with and without food residue.

The proportions of subjects with decreasing numbers of opportunistic pathogens on the teeth (A), tongue (B), and mucosal (C) surfaces with and without food residues at 1, 4, and 6 months are shown. The numbers of subjects with food residues were 7, 7 and 7 for teeth, 8, 7 and 7 for the tongue, and 9, 7 and 7 for mucosa at 1, 4 and 6 months, respectively, after beginning professional care. The numbers of opportunistic pathogens were 2.8 ± 1.8 and 3.2 ± 1.3 for teeth, 3.6 ± 1.3 and 3.7 ± 0.9 on the tongue, and 3.4 ± 1.2 and 3.2 ± 1.1 on oral mucosal surfaces of elderly subjects with and without food residues, respectively, before the beginning of the study. Asterisks denote a significant difference in the chi-square test ($p < 0.05$, with food residues versus without food residues at 1, 4 or 6 months for each sample).

abridged by controlling opportunistic pathogens in this long-term care study.

The oral biofilm is produced by the sequential attachment of bacteria; and is dependent on the various bacteria and the composition of the hard tissues involved²²⁻²⁴. Microorganisms become attached to and accumulate on surfaces of the oral cavity²⁵. And the biofilm is known to be able to evade antimicrobial challenges from antibiotics or host immune defenses using multiple mechanisms²⁶⁻²⁸ where antimicrobial agents fail to fully penetrate the bacterial cells that compose the biofilm²⁷. Further, the bacterial community may increase on hard tissue surfaces presenting considerable hygiene and host-defense problems for elderly individuals²⁹. Here our data shows remaining food residues made cleaning difficult to remove opportunistic pathogens from teeth surfaces in long-term routine care (Fig. 4A). Such food residues provide nutrition for microbial growth as well as a colonization site for biofilm formation. In a previous report on special oral care, the number of streptococci recovered shortly after treatment was reduced^{30,31}. Using oral professionals to remove the biofilm and calculus and mouth washing with 0.5% povidone-iodine solution cleared the tooth and mucosal surfaces; and this then allowed re-establishment and growth by commensal bacteria such as streptococci that replace infections by opportunistic pathogens³¹. Professional oral care may be useful in elderly patients to prevent respiratory infections; however, routine oral care without professional care does not show a significant effect on the microbiological community of the oral cavity³². Therefore, we considered routine oral care with professional oral care cleaned the teeth and mucosal surfaces after which beneficial commensal bacteria re-established and grew dependent on the amount of the remaining food residues in the oral cavities of the elderly subjects. Thus, routine oral care over a long term that completely cleans the oral cavity may be necessary to remove biofilm and re-establish microbiological flora with the commensal bacteria.

In conclusion, routine oral cleaning along with professional care was able to control infection with many types of opportunistic pathogens on teeth and denture surfaces using long-term care of the institutionalized elderly but was not of value in short-term care; however, on the tongue and mucosal surfaces opportunistic pathogens were removed during the short term. Our data indicates the important role of routine oral care in cleaning hard and soft surfaces of the oral cavity where this improves the oral health for institutionalized

elderly individuals.

Acknowledgements

The authors thank the Tokyo Prefecture Toshima Ward Dental Association for their technical support in regard to oral care and sampling as well as their helpful advice. This work was supported in part by a grant-in aid for the Development of Scientific Research (15390571) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; and by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H16-medical treatment-014).

References

1. Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, *et al.* N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology* 2003;49:301-309.
2. Simons D, Kidd EA, Beighton D. Oral health of elderly occupants in residential homes. *Lancet* 1999;353:1761.
3. Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, *et al.* Oral care and pneumonia. Oral Care Working Group. *Lancet* 1999;354:515.
4. Pinto A, Yanai M, Nakagawa T, *et al.* Swallowing reflex in the night. *Lancet* 1994;344:820-821.
5. El-Solh AA, Pietrantonio C, Bhat A, *et al.* Microbiology of severe aspiration pneumonia in institutionalized elderly. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1650-1654.
6. El-Solh AA, Sikka P, Ramadan F, *et al.* Etiology of severe pneumonia in the very elderly. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:645-651.
7. El-Solh AA, Aquilina AT, Dhillon RS, *et al.* Impact of invasive strategy on management of antimicrobial treatment failure in institutionalized older people with severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1038-1043.
8. El-Solh AA, Pietrantonio C, Bhat A, *et al.* Colonization of dental plaques: a reservoir of respiratory pathogens for hospital-acquired pneumonia in institutionalized elders. *Chest* 2004;126:1575-1582.
9. Fourrier F, Duviols B, Boutigny H, *et al.* Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. *Crit Care Med* 1998;26:301-308.
10. Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, *et al.* Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:557-563.
11. Mojon P, Budtz-Jorgensen E, Michel JP, *et al.* Oral health and history of respiratory tract infection in frail institutionalized elders. *Gerodontology* 1997;14:9-16.
12. Yoneyama T, Yoshida M, Ohnishi T, *et al.* Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:430-433.
13. Yoneyama T, Hashimoto K, Fukuda H, *et al.* Oral hygiene reduces respiratory infections in elderly bed-bound nursing home patients. *Arch Gerontol Geriatr* 1996;22:11-9.
14. Salam MA, Senpuku H, Nomura Y, *et al.* Isolation of opportunistic pathogens in dental plaque, saliva and tonsil samples from elderly. *Jpn J Infect Dis* 2001;54:193-195.
15. Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MR, *et al.* *Bergey's Manual*

- of Systematic Bacteriology. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 1989, Vol 1-4.
17. Marsh PD, Percival RS, Challacombe SJ. The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. *J Dent Res* 1992;71:1374-1381.
 18. Scannapieco FA. Pneumonia in nonambulatory patients. The role of oral bacteria and oral hygiene. *J Am Dent Assoc* 2006;137:21S-5S.
 19. Tambyah PA, Habib AG, Ng TM, McGarry SA, *et al*. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Singapore is usually "Health care associated". *Infect. Control Hosp Epidemiol* 2003;24:436-438.
 20. Freedom ND, Kaye KS, Stout JE, *et al*. Health care-associated blood stream infections in adults. A reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002;137:791-797.
 21. Morin CA, Hadler JL. Population-based incidence and characteristics of community-onset *Staphylococcus aureus* infections with bacteremia in 4 metropolitan Connecticut areas. *J Infect Dis* 2001;184:1029-1034.
 22. McEldowney S, Fletcher M. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Arch Microbiol* 1987;148:57-62.
 23. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, *et al*. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 1982;53:223-230.
 24. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-380.
 25. Gibbons RJ. Role of adhesion in microbial colonization of host tissues. a contribution of oral microbiology. *J Dent Res* 1996;75:866-870.
 26. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
 27. Millward TA, Wilson M. The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms. *Microbios* 1989;58:155-164.
 28. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996;44:79-87.
 29. Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. *J Med Microbiol*, 1991;35:5-11.
 30. Takeuchi H, Senpuku H, Matin K, *et al*. New dental drug delivery system for removing mutans streptococci from the oral cavity effect on oral micro flora. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2000. 53:211-212.
 31. Yoneda S, Imai S, Hanada N, *et al*. Effects of oral care on development of oral mucositis and Microorganisms in patients and Microorganisms in patients with esophageal cancer. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2007;60:23-28.
 32. Yoneyama T, Hashimoto K, Fukuda H, *et al*. Oral hygiene reduces respiratory infections in elderly bed-bound nursing home patients. *Arch Gerontol Geriatr.* 1996;22:11-9.

今月の表紙

JUL.2008



細菌間相互作用における乳酸菌の口腔バイオフィーム形成抑制効果

せんぶくひでのぶ 泉福英信¹ くまだまさゆき 熊田昌幸² たがみじゅんじ 田上順次²

¹国立感染症研究所 細菌第一部
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
²東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 う蝕制御学分野
〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45

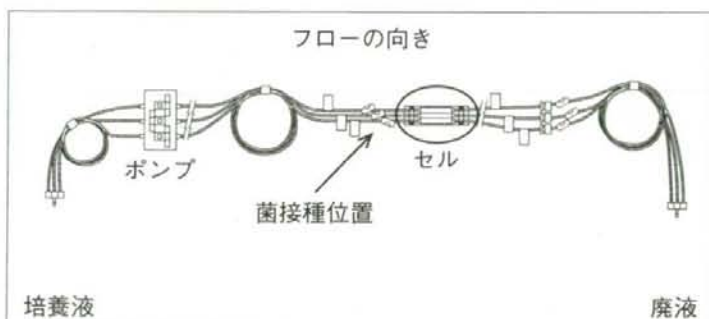


図1 フローセルシステム
①滅菌した唾液（ペリクル成分）をセル内に注入し、セル内表面をペリクルでコーティングする。
②ポンプで培養液を送液し、フローセルシステム内を培養液で満たす。
③注射器を用いて菌液をセル内に注入する。
④セルを逆位置にして1時間静置後、正位置に戻してフローを開始する。
⑤培養終了後、セル内部を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

表紙の写真は、フェーカリス菌 BIO-3B 株（以下《BIO-3B》）が“う蝕の原因”とされる *Streptococcus mutans* の菌面におけるバイオフィーム形成に対する阻害効果を示している様子を、共焦点レーザー顕微鏡で撮影した像である。

歯の表面は唾液成分からなるペリクルと呼ばれる被膜で覆われており、このペリクル表面に口腔内に存在するミュータンスレンサ球菌 (*S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*) が結合、さらに菌面上で増殖し、凝集することによりバイオフィームが形成される。ミュータンスレンサ球菌によって形成されたバイオフィームでは、菌が産生した酸が内部に蓄積され、局所的に低 pH 状態となるため、菌の構成成分であるエナメル質の溶解が起こり、う

蝕の危険性はきわめて高くなる。

一方、プロバイオティクスとして医薬品などで広く利用されている乳酸菌は、整腸作用の他、抗アレルギー作用、脂質代謝改善作用、歯周病関連菌に対する抗菌作用など、その有用性は広がりを見せている^{1,2)}。

本研究では菌の表面を実験的に再現するフローセルシステム（図1）を構築し、ミュータンスレンサ球菌が形成するバイオフィームに対して、乳酸菌の一種である《BIO-3B》が及ぼす影響について検討した³⁾。

その結果、唾液をコーティングしたフローセル内でミュータンスレンサ球菌と《BIO-3B》を混合培養し形成されたバイオフィームを観察したところ、

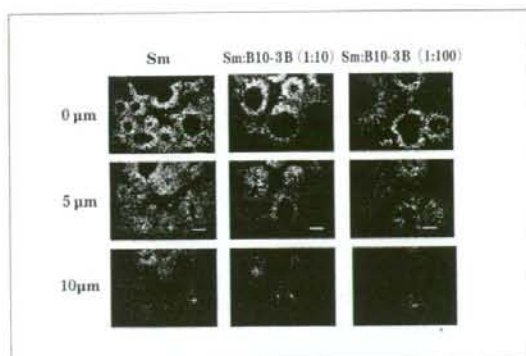


図2 *S. mutans* と《BIO-3B》との混合培養におけるバイオフィーム形成。 *S. mutans* (Sm) と《BIO-3B》を1:0, 1:10, 1:100の菌量で混ぜ、フローセルシステムにてバイオフィーム形成実験を行った。Live/Dead染色法にて生菌と死菌を染め、共焦点レーザー顕微鏡にてバイオフィーム底面から0 μm, 5 μm, 10 μmの水平面を観察した。

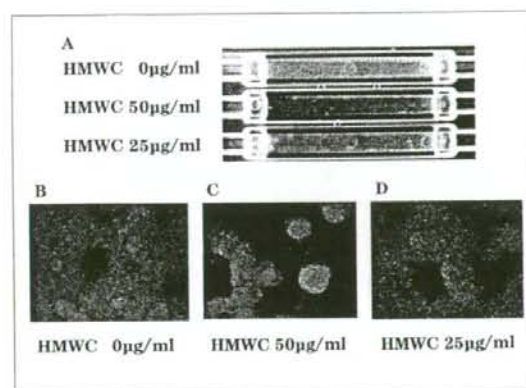


図3 《BIO-3B》から粗精製された高分子複合物質 (HMWC) による *S. mutans* バイオフィーム抑制効果。
A: フローセル内バイオフィーム。
B・C・D: フローセル内バイオフィームの共焦点レーザー顕微鏡による観察。 *S. mutans* バイオフィーム形成に0, 25, 50 μg/mlのHMWCを添加した。

《BIO-3B》の菌量に依存してバイオフィームが抑制された。共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィーム内部を観察したところ、ミュータンスレンサ球菌を単独で培養した場合と比較して、バイオフィーム内部の空洞化および間隙増加が確認され、その効果は《BIO-3B》量を増加することにより、さらに顕著に見られた(図2)。しかし、《BIO-3B》と同様に乳酸菌として知られている *Lactobacillus casei* や *Lactobacillus salivarius* ではこのような効果は確認されなかったことから、同じ乳酸菌でも、菌の表面におけるバイオフィーム形成に関しては異なった影響を及ぼすことが確認された。

さらに、この《BIO-3B》を超音波破砕機で抽出しゲル濾過クロマトグラフィーにて粗精製された高分子複合物質 (HMWC) を用いて同様の

実験を行ったところ、《BIO-3B》の場合と同様の効果が確認された(図3)。このことから《BIO-3B》がう蝕の原因となるバイオフィーム形成を抑制する物質を産生していることが実証された。将来的に《BIO-3B》あるいはその成分は、う蝕予防薬の開発に貢献するものと期待される。

参考文献

- 1) De Roos NM and Katan MB: Effects of a probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr*, 71: 405-411, 2000.
- 2) Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, et al: Probiotics in primary prevention of atopic diseases: a randomized placebo-controlled trial. *Lanset*, 357: 1076-1079, 2001.
- 3) Kumada M, Senpuku H, Motegi M, et al: Effects of *Enterococcus faecium* on *Streptococcus mutans* biofilm formation using flow cell system. *J Oral Biosc*, 50: 68-76, 2008.

緑膿菌性尿路感染症：どう対峙するか

門田晃一 狩山玲子 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

尿路感染症難治化の要因は主に細菌の薬剤耐性と宿主病態の複雑化による。近年、尿路感染症の原因菌として問題となっている薬剤耐性菌として多剤耐性緑膿菌があげられる。多剤耐性緑膿菌による尿路感染症の多くは留置カテーテルが関与しており院内感染の主たる汚染源となっている。我々は、緑膿菌（特にメタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌）が分離された尿路感染症を対象に臨床的解析を行ったので報告する。

尿路感染症における最大の難治化要因は留置カテーテルであるが、留置カテーテル尿路感染症の主たる原因菌もまた緑膿菌である。留置カテーテルは細菌の尿路への侵入と定着を促進し、さらにバイオフィーム形成の場を提供する。細菌バイオフィームは抗菌薬や生体側からの感染防御系に対して抵抗性因子となることから尿路バイオフィーム感染症は難治性を示す。これまで細菌バイオフィームの制圧こそが難治性尿路感染症克服の鍵とされ、種々の抗菌薬療法が検討されてきた。我々も緑膿菌性尿路バイオフィーム感染症に対しフルオロキノロンと fosfomycin (FOM) の併用療法の有用性を報告し、一定の効果を確認した。しかし、尿路バイオフィーム感染症に対して既製の抗菌薬療法では限界があるのも事実であり、不完全な抗菌薬治療が耐性菌を助長する危険性も否定できない。今後の展開として、病原性（毒素産生やバイオフィーム形成）の抑制などバイオフィーム感染の制御・共棲を目的とした治療法の開発が重要と考える。Quorum-sensing をターゲットとした戦略もその一つである。我々は、バイオフィーム実験モデル系として、キャビラリー フロー セルシステムを再現性のある実験系として確立し、quorum-

sensing 機構の拮抗剤・阻害剤、ポリフェノール類の尿中代謝物、抗菌薬などの評価を行い、尿路バイオフィームに対する予防法および治療法の開発を目指している。

II. 緑膿菌性尿路感染症の特性

尿路感染症は、尿流障害の原因となる器質的病変（前立腺疾患、尿路腫瘍、尿路結石など）あるいは神経学的疾患（神経因性膀胱）など基礎疾患の有無により、単純性尿路感染症と複雑性尿路感染症に分類される。緑膿菌感染症は健康な宿主（ヒト）では成立せず¹⁾、緑膿菌が単純性尿路感染症の起炎菌となることはない。一方、尿路に基礎疾患を有する複雑性尿路感染症、特に尿路にカテーテルが留置された患者からは頻繁に分離され、緑膿菌は尿路感染症の原因菌となる代表的な菌種のひとつである。

緑膿菌は一旦、尿路上皮あるいは尿路内異物（結石、カテーテル）に付着すると、そのすぐれた環境適応能力として菌体外多糖（グリコカリックス）を産生する。緑膿菌はこの菌体外多糖によりさらに強固に付着し、増殖を続けることにより緑膿菌バイオフィームを形成する。緑膿菌をはじめとする細菌バイオフィームの形成は、抗菌薬および生体の感染防御系からの隠れ家となり、難治化の重要な因子となる^{2,3)}。緑膿菌は元来弱毒菌であり、たとえ尿路に基礎疾患を有していても尿流動態が比較的良好（尿路閉塞が無い状態）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。また細菌バイオフィームを形成することにより抗菌薬に抵抗性、難治性を示すことが知られている。したがって慢性期の緑膿菌性尿路感染症、特にカテーテル留置症例に対する治療は尿

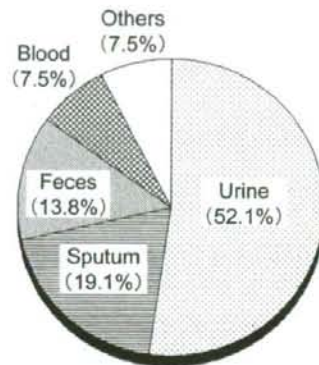
流動態の改善と尿路基礎疾患の除去が中心であり、原則として除菌を目的とした化学療法の適応とはならない⁴⁾。その一方で緑膿菌性尿路感染症患者はいわゆる緑膿菌保菌者となるケースが多く、病院、病棟内で交差感染の感染源となり得る。

緑膿菌性尿路感染症は尿流動態が良好に保たれていれば、臨床症状に乏しい慢性持続感染症である。しかし、ひとたび結石の尿管内嵌頓やカテーテル内腔の閉塞などにより尿流障害が生じ、尿路内圧が急激に上昇した場合には、緑膿菌は機械的に腎実質および血中に侵入し、尿性敗血症を含む重症感染症を引き起こす。さらに緑膿菌自体、抗菌薬の菌体内移行が不良であり、また耐性菌が出現しやすいことから⁵⁾、重篤例に至る場合も少なくない。以前、著者らは緑膿菌による尿路バイオフィーム感染症の急性増悪モデルをラットで作製し、宿主に与える影響を検討した。ラットの膀胱内に経尿道的にポリエチレンチューブを挿入し、引き続き緑膿菌を接種すると、接種2日後にはチューブ上に緑膿菌バイオフィームが形成される。このラットの尿道を8時間クランプすると2日以内にすべてのラットの血中から緑膿菌が検出され、経時的に増加し菌血症の状態となる。シクロスポリン投与による免疫抑制ラットの死亡率は100%であった⁶⁾。このことは、慢性期の尿路バイオフィーム感染症が尿路閉塞という臨床上日常的に起こり得るトラブルを契機に急性増悪として尿性敗血症を生じ、特に免疫抑制宿主においては致死的となることを示唆している。

III. 多剤耐性緑膿菌による尿路感染症の現状

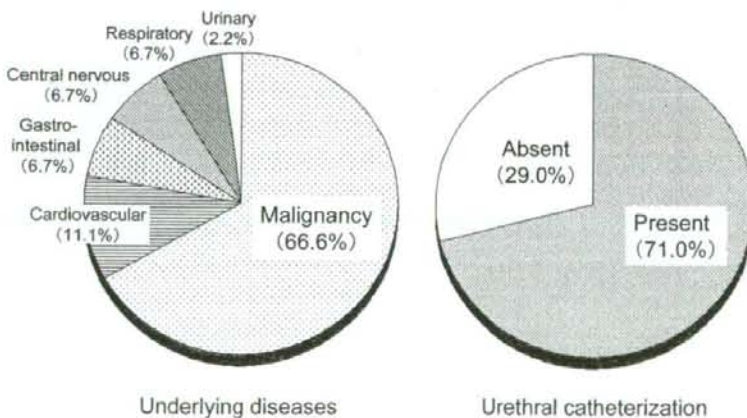
近年、methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) やメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生緑膿菌など多剤耐性菌による院内感染が問題となっている。岡山大学病院においても、MBL産生緑膿菌の分離頻度および全分離緑膿菌に対するMBL産生緑膿菌の占める割合は年々上昇傾向にある。

岡山大学病院におけるMBL産生緑膿菌(2004～2006年・94株)の分離材料を検討すると、52.1%が尿由来で占めていた(図1)。さらに、MBL産生緑膿菌による尿路感染症(2001～2006年・81症



(Total: 94 isolates)

Fig. 1 Percentage of clinical sites among metallo-β-lactamase-producing *P. aeruginosa* isolated in Okayama University Hospital from 2004 through 2006.



(Total: 81 cases)

Fig. 2 Clinical backgrounds of patients with urinary tract infections caused by metallo-β-lactamase-producing *P. aeruginosa* in Okayama University Hospital from 2001 through 2006.

例)の臨床背景を検討すると(図2)、宿主の基礎疾患は悪性腫瘍が最も多く(66.6%)、その多く(71.0%)が尿路カテーテルを留置していた。つまり、免疫抑制宿主を主体とした長期入院患者が尿路カテーテルを留置され、MBL産生緑膿菌が尿路に侵入し尿路感染症を発症したものと考えられる。こうした患者の細菌尿を汚染源として、多剤耐性緑膿菌が交差感染を繰り返し、院内に拡散する危険性も否定できない。また、29.0%の症例では有熱性尿路感染症に移行しており、重篤化すれば宿主にとって致命的な病態となることは容易に推察できる。MBL産生緑膿菌による尿路感染症は、その慢性期においては院内感染に深く関与し交差感染の主たる汚染源となっている可能性があることに加え、尿流動態の悪化に伴い急性感染症に移行し宿主の状態を重篤化させる病態であると考えられる。

IV. 緑膿菌性尿路感染症にどう対峙するか?

緑膿菌性尿路感染症を含め尿路バイオフィーム感染症に対し抗菌性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。臨床症状に乏しい慢性期においては尿流動態の改善とバイオフィーム形成に関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とならない患者では、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、新たな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く、今後の課題と考える。

これまで尿路バイオフィーム感染症に対する抗菌性化学療法は、併用療法を中心に検討されてきた。著者らは尿路バイオフィーム感染症に対し有効な治療法を考案する目的でmodified Robbins deviceを用いた実験系で緑膿菌性バイオフィームを形成し、各種抗菌性物質の効果を検討した。単剤で緑膿菌性バイオフィームに有効な薬剤が存在しないことから、バイオフィームでの薬剤透過性亢進作用をもつ可能性を有するFOMと、単独療法で細菌バイオフィームに対してある程度殺菌的作用を示すofloxacin(OFLX)を併用し検討した。その結果、FOM+OFLX併用療法は、*in vitro*では優れた殺菌効果を示した⁶⁾。ただし、これらの併用療法が臨床的に効果を示す確証は得られておらず、今後、抗菌薬療法の適応と限界を見極めることが重要である。

現在、バイオフィーム感染症が成立した症例では、抗菌薬療法で除菌することは難しい。バイオフィーム感染症を制圧するのではなく制御することが現実的と考える。具体的には、バイオフィームの増殖や病原性の抑制を目的とした治療法や、バイオフィーム形成の危険性が高い症例に対して、細菌の定着やバイオフィーム形成を阻止することを目的とした予防法などが考えられる。

臨床の場で最も高頻度に遭遇する尿路バイオフィーム感染症であるカテーテル留置尿路感染症を予防するために、これまで銀イオンの抗菌作用を応用した抗菌カテーテルが開発されてきた。著者らもクエン酸銀と界面活性剤であるレシチンを配合した新しいカテーテル素材をクリエートメデック社と共同開発し、シリコンと比べ明らかに高い抗バイオフィーム効果を報告した⁷⁾。しかし、実際には、特に留置期間が長期化すると通常のカテーテルと比較して抗バイオフィーム効果に大差はなく、持続性という観点からは限界がある。

一方、薬物療法による予防法もいくつか報告されている。クランベリージュースは尿路感染症の予防効果を有するが、そのメカニズムとして尿の酸性化作用やプロアントシアニンによる抗酸化作用が知られている。また、尿路における抗バイオフィーム効果も報告されている。Reidらは脊髓損傷の尿路感染症患者を対象とした臨床試験で、水分摂取とクランベリージュース摂取時の尿路におけるバイオフィーム形成状況を細胞に付着した菌数で比較し、クランベリージュースの抗バイオフィーム効果を確認している⁸⁾。

最近の話題として、quorum-sensing機構を標的とした抗バイオフィーム剤の開発も盛んである。著者らも新しい複雑性尿路感染症の実験モデル系(キャピラリーフローセルシステム)を用いて、抗バイオフィーム剤の探索を目指している⁹⁾。本システムは、緑膿菌が形成したバイオフィームを共焦点レーザー走査型顕微鏡でリアルタイムに観察して、抗バイオフィーム剤の評価を行うときに最も威力を発揮する。この実験系を用いて新規治療法の開発を行うとともに緑膿菌性尿路バイオフィーム感染症の発症病理、病態、重症度の危険因子などの臨床的解析を予定している。

V. おわりに

現在、バイオフィーム感染症の薬物治療や予防法に関しては、実施可能なものから全くの研究段

階まで様々である。しかし、現時点では基礎疾患の除去が尿路バイオフィーム感染症を制圧する最も有効な手段である。何らかの理由で基礎疾患の除去が困難で慢性尿路感染症を容認する場合、(1)カテーテルの閉塞に注意し急性増悪の発症を予防する、(2)急性増悪期に備え、定期的に尿の監視培養を実施する。(3)手洗いを中心とした交差感染対策を徹底することが肝要と考える。

VI. 文 献

- 1) 本間 遜：緑膿菌研究の重要性とその歩み。日本臨牀 49(10): 2201-2206, 1991.
- 2) Costerton J.W. : The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. Rev. Infect. Dis. 6(suppl 3): S608-616, 1984.
- 3) 公文裕巳：Biofilm 感染症。総論。化学療法の領域 10(8)：1477-1485, 1994.
- 4) Kumon H. : Pathogenesis and management of bacterial biofilms in the urinary tract. J. Infect. Chemother. 2(1): 18-28, 1996.
- 5) 井上松久、久我明男：薬剤耐性機序“緑膿菌の今日的意味”。斎藤 厚、山口恵三 編。pp.57-65, 1996.
- 6) 門田晃一、公文裕巳：Biofilm 実験モデルによる尿路バイオフィーム感染症の解析。泌尿器外科 13(1): 107-110, 2000.
- 7) 橋本英昭、公文裕巳、斯波徹、他：抗菌性尿道留置カテーテルの開発に関する基礎的研究(第1報)抗菌性コーティング素材の開発。感染症学雑誌 74(5): 431-440, 2000.
- 8) Reid G., Hsieh J., Potter P. et al. : Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells: pilot study in spinal cord injured patients. Spinal Cord 39(1): 26-30, 2001.
- 9) 狩山玲子、門田晃一、公文裕巳：緑膿菌感染症制御への新戦略 緑膿菌性尿路感染症対策としての抗バイオフィーム剤探索とその基盤技術の開発。第41回緑膿菌感染症研究会講演記録 pp.39-43, 2007.

How should we manage patients with urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*?

Koichi Monden, Reiko Kariyama and Hiromi Kumon

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

Recently, multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP: resistant to imipenem, ciprofloxacin and amikacin) has become an increasing problem in Japanese hospitals, and MDRP isolates from patients with urinary tract infections (UTIs) are common. The majority of UTIs caused by MDRP are catheter-related and responsible for a growing number of nosocomial infections. We investigated clinical backgrounds of patients with UTIs caused by metallo- β -lactamase (MBL)-producing *P. aeruginosa*. Among MBL-producing *P. aeruginosa* isolated in Okayama University Hospital, 52.1% of all isolates were urine isolates. Upon review of the associated medical records for UTIs caused by MBL-producing *P. aeruginosa*, 66.6% of underlying diseases were malignancy, 71.1% of patients were catheterized, and 29.0% of patients had forthcoming febrile episodes. Antimicrobial therapy for biofilm infections in the urinary tract included UTIs caused by *P. aeruginosa* is limited. The continuation of ineffective antimicrobial therapy promotes resistance of *P. aeruginosa*. It is important to develop compounds that can regulate biofilm formation and production of toxin. The quorum-sensing system of *P. aeruginosa* has been targeted by investigators seeking novel therapeutic agents. In our laboratory, a capillary flow cell system as an *in vitro* model of complicated UTIs is utilized. In this system, we have tested agonists and antagonists of quorum sensing, polyphenols and antimicrobial agents. We are continuing efforts to identify antibiofilm agents using more suitable experimental models for prevention and therapy of UTIs.

メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌の バイオフィーム形成能と耐性遺伝子伝達性の検討

山本満寿美¹⁾ 狩山玲子²⁾ 光畑律子²⁾ 石井亜矢乃²⁾
上原慎也²⁾ 渡辺豊彦²⁾ 門田晃一²⁾ 公文裕巳²⁾ 草野展周³⁾

¹⁾ 岡山大学大学院保健学研究科 ²⁾ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学 ³⁾ 岡山大学病院中央検査部

I. はじめに

緑膿菌は自己の生育に不利なストレス環境を感じ、菌体外多糖体を産生することにより、複数の多糖体(グリコカリックス)を主とするポリマーで包まれたバイオフィームを形成する¹⁾。バイオフィームを形成した緑膿菌は長期間使用している環境備品や医療器具だけでなく、生体内においても菌体周辺の粘着性物質(アルギネートないしムコイド)を介して粘膜に間接的に付着するとともに、フィブリン、血小板などが加わり強固なバイオフィームを形成し、抗菌薬や消毒薬に高い抵抗性を示す。緑膿菌には異なる薬剤耐性機序が存在し、バイオフィームの形成のほかに不活化酵素の産生、作用点の変異、透過性障害、排出ポンプ機能の亢進などがある。特に近年では、不活化酵素産生による耐性として、メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生菌の出現が問題になってきている^{2,4)}。MBL産生緑膿菌はプラスミド性耐性遺伝子を保有し、プラスミドの伝播に伴って薬剤耐性が拡散していくため院内感染対策上特に留意する必要がある。

本研究では、岡山県下3施設から分離されたMBL産生緑膿菌のバイオフィーム形成能を定量化し、耐性遺伝子の伝達性に関する検討ならびに分子疫学的検討を行った。

II. 材料と方法

1. 対象

岡山県下3施設で2001年から2006年の6年間に分離されたMBL産生緑膿菌143株(1症例1株)を対象とした。その材料別内訳は、尿(85株)、喀

痰(12株)、便(10株)、膿(8株)、血液(6株)、その他(22株)であった。

2. PCR法

IMP-1型(*bla*_{IMP-1})およびVIM-2型(*bla*_{VIM-2})耐性遺伝子保有の確認は、柴田らの報告⁵⁾に準じて行った。

3. バイオフィームアッセイ

TSB (tryptic soy broth) 培地中、供試菌を37℃一晩培養、100倍希釈して96穴ポリスチレン製減菌平底プレートに分注した。37℃で24時間静置培養後、プレートを蒸留水で洗い乾燥させた後、0.3%クリスタルバイオレットで45分間染色した。再度蒸留水で洗い乾燥させた後、付着したクリスタルバイオレットを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(OD₅₇₀値)を行った。

4. 接合伝達実験

IMP-1型耐性遺伝子を保有する15株(バイオフィーム高度・中等度・低度形成群、それぞれ5株)を供与菌、リファンピシン耐性の*P. aeruginosa* ML5017株を受容菌として用いた。選択培地はミューラーヒントン寒天培地(MHA)にイミペネム(8μg/ml)とリファンピシン(100μg/ml)を添加して作製した。ミューラーヒントンブイヨン培地(MHB)に一晩振盪培養した供与菌と受容菌の菌液を1:10の割合で混合し、その混合液をメンブランフィルター(0.45μm)を通して、MHA上37℃で一晩培養した。フィルター上に発育した菌をMHBに懸濁させ、希釈液を選択培地に広げた。48時間後、選

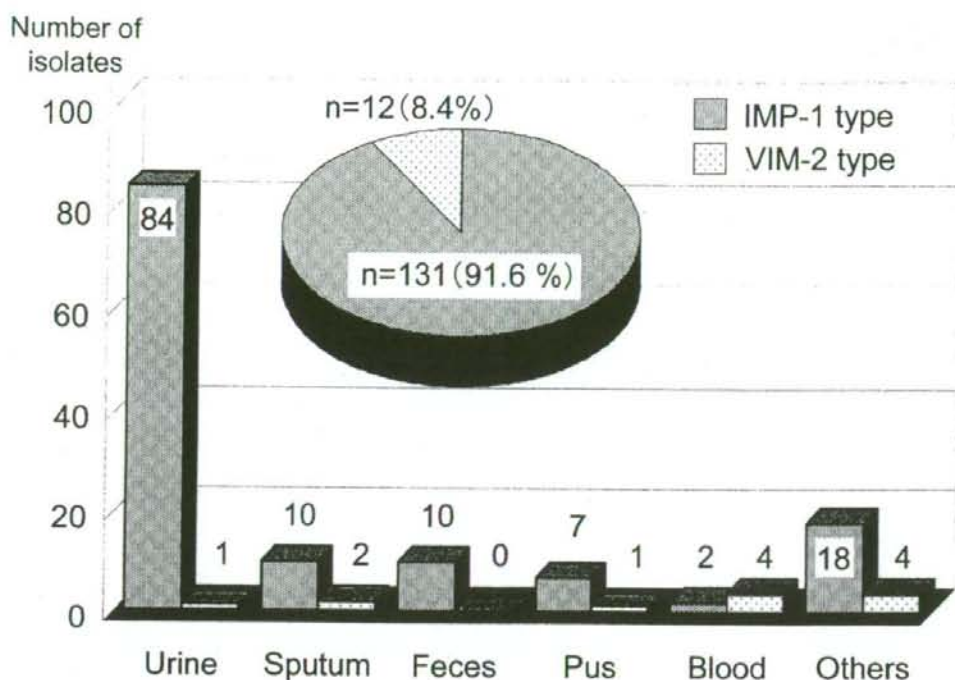


Fig. 1 Presence of *bla*_{IMP-1} (IMP-1 type) or *bla*_{VIM-2} (VIM-2 type) gene in 143 metallo-β-lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates.

択培地上に発育したコロニーを数えて伝達株数を求め、供与菌数あたりの伝達頻度を算出した。

5. バルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法)

BIO-RAD 社のプロトコールに準じて PFGE 法を行った。供試菌を 0.5 mL TSB 中、37℃で一晩培養し、遠心後、沈渣に cell suspension buffer を 0.5 mL 加え懸濁した。55℃に加熱した 1.2% chromosomal grade agarose 50 μL に再懸濁した菌液を等量混合し、ゲルブロックを作製した。24 穴プレートにゲルブロックを入れ、lysozyme solution を 0.5 mL ずつ加え、37℃で 2 時間緩やかに振盪させた後、proteinase K solution 0.5 mL に交換し、50℃で一晩静置した。Wash buffer 1 mL で室温 30 分 3 回、0.1 × wash buffer 1 mL で室温 30 分 1 回、緩やかに振盪しながら洗浄した。ゲルブロックを 1 mm 幅程度にカットし、*Spe* I buffer (10 U/200 μL) 中 37℃で一晩振盪した。8% pulsed field certified agarose に制限酵素処理したゲルをアプライし、CHEF DR-III にて泳動した。泳動条件は電圧 6V/cm、パルスタイム 1~23 秒、泳動時間は 18.5 時間、泳動バッファー温度 14℃、サイズマーカーは lambda ladder、バッファーは 0.5 × TBE を用いた。泳動終了後、アガロースゲルを 1 × SYBR Green I で染色し、

GelDoc XR にて撮影した。クラスター解析には Fingerprinting II を使用した。

III. 成績

1. IMP-1 型・VIM-2 型遺伝子の保有状況

材料別内訳は、IMP-1 型遺伝子保有株 (131 株) が尿 84 株 (64.1%)、喀痰 10 株、便 10 株、膿 7 株、血液 2 株、その他 18 株であり、VIM-2 型遺伝子保有株 (12 株) が尿 1 株、喀痰 2 株、便 0 株、膿 1 株、血液 4 株、その他 4 株であった。IMP-1 型と VIM-2 型遺伝子保有率は、それぞれ 91.6% と 8.4% であった (Fig. 1)。

2. MBL 産生緑膿菌株のバイオフィーム形成能

MBL 産生緑膿菌 143 株のバイオフィーム形成能を OD₅₇₀ 値に基づき、高度形成群 (OD₅₇₀ ≥ 1)、中等度形成群 (1 > OD₅₇₀ ≥ 0.5)、低度形成群 (0.5 > OD₅₇₀ ≥ 0) の 3 群に分類すると、高度形成群は 34 株 (23.8%)、中等度 49 株 (34.2%)、低度 60 株 (42.0%) であった (Fig. 2)。IMP-1 型遺伝子保有株はバイオフィーム形成能 3 群全てに認められたが、VIM-2 型遺伝子保有株は 12 株全てが低度形成群であった。バイオフィーム形成能の平均

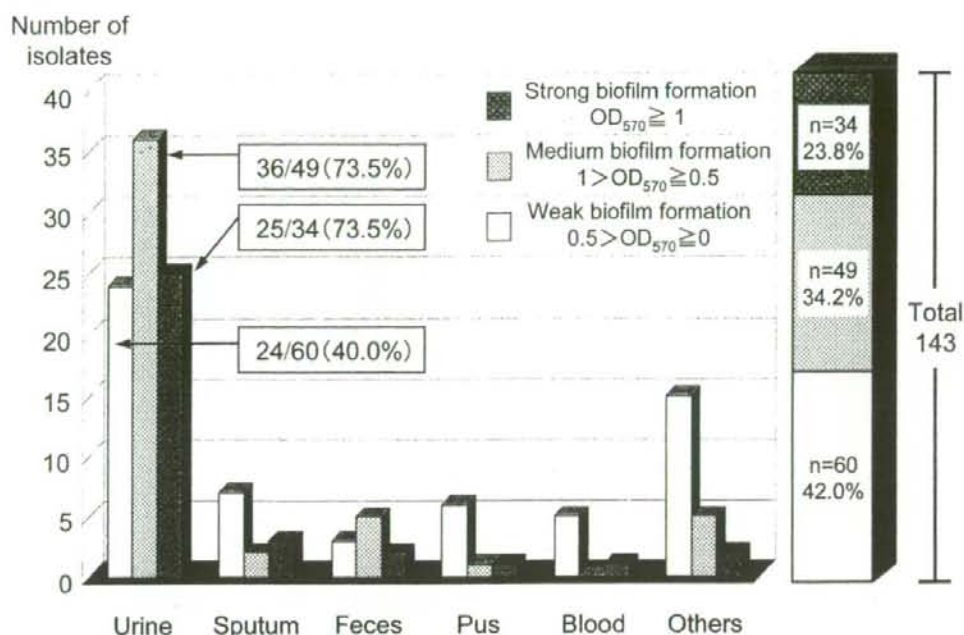


Fig. 2 Biofilm-forming capabilities of 143 metallo-β-lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates.

OD₅₇₀ 値 (n=143) は 0.69 ± 0.04 (Mean ± SE) であった。材料別に比較すると、尿由来株は高度形成群 34 株中 25 株 (73.5%)、中等度形成群 49 株中 36 株 (73.5%)、低度形成群 60 株中 24 株 (40.0%) であり、他の材料別由来株に比して高いバイオフィーム形成能を示す株を多く認めた (Fig. 2)。施設別に比較すると、A 病院 95 株のうち高度・中等度・低度形成群の菌株は、それぞれ 15 株・25 株・55 株、平均 OD₅₇₀ 値は 0.55 ± 0.04 (Mean ± SE) であった。B 病院 (41 株) は 19 株・20 株・2 株、1.05 ± 0.07 (Mean ± SE)、C 病院 (7 株) は高度形成群の菌株はなく、中等度・低度形成能はそれぞれ 4 株・3 株、0.48 ± 0.06 (Mean ± SE) であった。

3. 接合伝達実験

伝達性を検討した IMP-1 型遺伝子保有 15 株 (バイオフィーム高度・中等度・低度形成群、それぞれ 5 株) のうち、高度形成群の 2 株、中等度形成群の 1 株、低度形成群の 2 株、計 5 株にイミペネム耐性の伝達を認め、その伝達頻度は 10⁻³ ~ 10⁻⁵ であった。

4. MBL 産生緑膿菌株の PFGE 解析

A 病院と B 病院で分離されたバイオフィーム高度形成群の菌株について、それぞれ 15 株ずつ

PFGE 解析を行った。PFGE 解析を行った 30 株中、類似係数 100% の同一株は A・B 病院ともに認めなかったが、類似係数 80% 以上の類似株を B 病院において 2 組 (2 株・3 株) 認めた (Fig. 3)。類似株の分離日には、1 組 (2 株) が 5 日、1 組 (3 株) が 20 日から 40 日の隔りがあった。

IV. 考察

本研究において対象とした MBL 産生緑膿菌 143 株のバイオフィーム形成能の平均 OD₅₇₀ 値 0.69 ± 0.04 (Mean ± SE) は、渡辺らが報告した尿路感染症由来緑膿菌 166 株の平均 OD₅₇₀ 値 0.21 ± 0.02 (Mean ± SE) に比して⁶⁾、約 3 倍の高値を示した。143 株中 83 (58.0%) 株がバイオフィーム高度・中等度形成群に属する菌株であった。83 株中 61 株 (73.5%) は尿由来株であり、他の材料別株に比して高いバイオフィーム形成能を示す株が多く認められた。MBL 産生緑膿菌の尿路からの分離率が高いこと、またバイオフィーム形成能の高い菌株が多いことから、尿路留置カテーテルにバイオフィームが形成されやすいだけでなく、カテーテルの閉塞による尿流障害を契機に尿路バイオフィーム感染症が急性増悪し、尿性敗血症を引き起こす危険性は高い⁷⁾。平潟らは MBL 産生緑膿菌の 76.6% がイミペネム (IPM)、ゲンタマイシン (GM)、シ

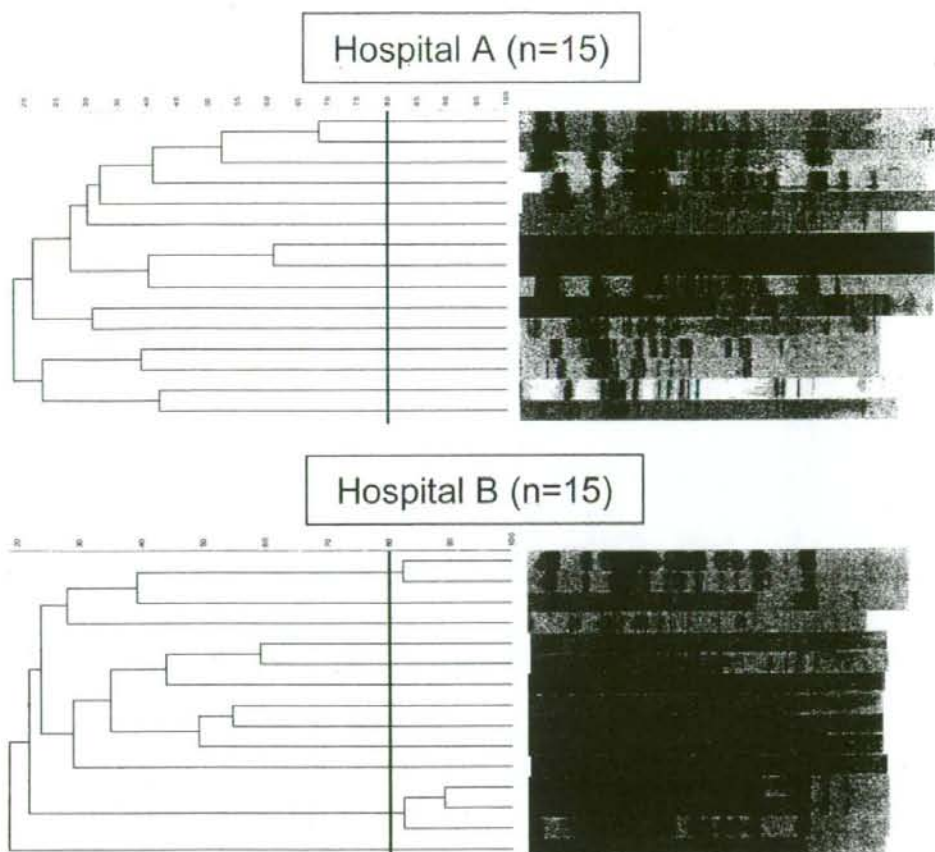


Fig. 3 Dendrogram of metallo-β-lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates exhibited strong biofilm formation (15 isolates from each of two hospitals, A and B).

プロフロキサシン (CPFX) の3剤に耐性を示す多剤耐性緑膿菌 (MDRP) であったと報告しており⁸⁾、本研究の対象株である MBL 産生緑膿菌の多くが MDRP である可能性は否定できない。MDRP は必ずしも感染症の起原菌となっていない⁸⁾ ことから、MBL 産生緑膿菌が分離された多くの症例において、保菌した状態で原疾患の治療や医療処置を受けていたことが推察された。

バイオフィーム形成能の平均 OD₅₇₀ 値は、B 病院が 1.05、A 病院と C 病院はそれぞれ 0.55 と 0.48 であり、3 病院の中で B 病院は高いバイオフィーム形成能を示す株を多く認めた。A 病院と B 病院のバイオフィーム高度形成群 15 株の PFGE 解析において、両病院とも同一株は認めなかったが、B 病院においては類似株を 2 組認めた。この 2 組 5 株が分離された材料は 4 株が尿、1 株が便であったこと、分離日に 5 日～40 日の隔たりがあったことから、直接的な交差感染だけでなく、環境中に生息して

いた MBL 産生緑膿菌が変異し、間接的に伝播した可能性が考えられた。接合伝達実験では、IMP-1 型遺伝子保有 15 株中 5 株が 10^{-3} ～ 10^{-5} の伝達頻度でイミペネム耐性を伝達していた。伝達を認めた 5 株のうち、2 株がバイオフィーム高度形成群、1 株が中等度形成群、2 株が低度形成群であり、バイオフィーム形成能の高い菌株が必ずしも耐性遺伝子の伝達性が高いとは言えなかった。

本研究において対象とした MBL 産生緑膿菌のバイオフィーム形成能は高く、尿由来株の 73.5% が高度・中等度バイオフィーム形成能を有する菌株であった。また高度形成群の菌株のうち、B 病院において類似株を 2 組認め、直接的な交差感染だけでなく環境中に生息した MBL 産生緑膿菌を介した交差感染の可能性が示唆された。MBL 産生緑膿菌は菌自体の伝播・拡散だけでなく、プラスミドを介した MBL 産生遺伝子の菌株間の伝達を考慮し、プラスミド解析を行うことが今後の課題である。

V. 文献

- 1) Donlan R. M. et al.: Clin. Microbiol. Rev., 15: 167-193, 2002.
- 2) Kimura S. et al.: J. Clin. Microbiol., 43: 458-461, 2005.
- 3) 三澤成毅、他：日本化学療法学会雑誌, 55: 211-219, 2007.
- 4) Tsuchimochi N. et al.: J. Infect. Chemother., 14: 99-104, 2008.
- 5) 柴田尚宏：臨床検査, 45 : : 840-850, 2001.
- 6) 渡辺豊彦、他：第41回緑膿菌感染症研究会講演記録, 94-98, 2007.
- 7) 公文裕巳：Bacterial Adherence & Biofilm, 19: 9-16, 2005.
- 8) Hirakata Y. et al.: Clin. Infect. Dis., 37: 26-32, 2003.

Biofilm-forming capabilities and resistance gene transfer of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*

Masumi Yamamoto ¹⁾, Reiko Kariyama ²⁾, Ritsuko Mitsuhashi ²⁾, Ayano Ishii ²⁾, Shinya Uehara ²⁾, Toyohiko Watanabe ²⁾, Koichi Monden ²⁾, Hiromi Kumon ²⁾ and Nobuchika Kusano ³⁾

¹⁾ Graduate School of Health Sciences, Okayama University

²⁾ Department of Urology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

³⁾ Department of Clinical Laboratory, Okayama University Hospital

We investigated biofilm-forming capabilities and the transferability of resistance of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates and conducted a molecular epidemiology study by using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Over a 6-year period from 2001 through 2006, a total of 143 metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates, including 85 isolates from urine, 12 isolates from sputum, 10 isolates from feces, 8 isolates from pus, 6 isolates from blood and 22 isolates from other sites, were collected from patients (one isolate per patient) who were admitted to three hospitals in Okayama Prefecture, Japan. Of 143 isolates, 131 (91.6%) and 12 (8.4%) were IMP-1 type possessing *bla*_{IMP-1} and VIM-2 type possessing *bla*_{VIM-2}, respectively. We used the *in vitro* microtiter plate assay to quantify biofilm formation and classified into three groups: strong (OD₅₇₀ \geq 1), medium (OD₅₇₀ \geq 0.5 to < 1) and weak (OD₅₇₀ 0 to < 0.5). Of the 143 isolates, 34 (23.8%), 49 (34.2%) and 60 (42.0%) isolates exhibited strong, medium and weak biofilm formation, respectively. Of the 83 isolates exhibited strong and medium biofilm formation, 61 isolates (73.5%) were urine isolates. The biofilm-forming capabilities (mean \pm SE) of metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates in three hospital, A, B, and C, were 0.55 \pm 0.04 [n=95], 1.05 \pm 0.07 [n=41], and 0.48 \pm 0.06 [n=7], respectively. The imipenem resistance transferred by filter mating in 5 of 15 isolates tested, and these frequencies were in the range from 10⁻³ to 10⁻⁵. PFGE analysis showed that identical isolates in 30 metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates exhibited strong biofilm formation were not found, but 2 paired isolates in over 80% similarity were found in hospital B. The persistent biofilms formed by metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates could cause serious problems in nosocomial infections. The development of strategies to prevent spread of the organism in each hospital setting is needed.

〈原 著〉

誤嚥性肺炎患者の口腔内の状態と口腔ケアおよび口腔と吸引痰からの 検出菌に関する実態調査

形山 優子¹⁾・山本満寿美¹⁾・千田 好子¹⁾・狩山 玲子²⁾

Oral Condition and Oral Care of Patients with Aspiration Pneumonia and Microorganisms Detected in the Mouth and Sputum

Yuko KATAYAMA¹⁾, Masumi YAMAMOTO¹⁾, Yoshiko SENDA¹⁾ and Reiko KARIYAMA²⁾¹⁾Graduate School of Health Sciences, Okayama University²⁾Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

要 旨

急性期病院内で治療目的で入院した誤嚥性肺炎患者9名の口腔内の状態と口腔ケアおよび口腔と吸引痰からの検出菌に関する実態調査を行った。患者の平均年齢は77歳で、7名に誤嚥性肺炎の既往歴があった。患者の口腔内の状態は、入院時約半数に舌苔や口腔内乾燥がみられたが、退院時は改善傾向にあった。しかし、入院後の口腔ケアは、大半の患者に1日1回実施しているのが実状であり、十分な口腔内清浄度が保たれていなかった。入院時、入院後3～5日目、退院時の3回、日和見感染菌検査用キット(BML社)を使用し、口腔と吸引痰から検体を採取した。口腔または吸引痰からの検出菌(患者数)は、入院時:Candida sp.(4名), MRSA, *Serratia marcescens*(各3名), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*(各2名), 入院後3～5日目:MRSA(5名), *Candida* sp.(2名), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*(各1名), 退院時:MRSA(4名), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Candida* sp.(各2名), MSSA(1名)であった。本研究において、MRSAが最も多く検出され、入院時の3名に比して、入院後3～5日目には5名、退院時4名と増加しており、院内感染が疑われた。退院時に定着菌あるいは残存菌が検出された6名の患者は、再度誤嚥性肺炎に罹患する可能性が高いことから、口腔ケアへの積極的介入が必要とされた。また、耐性菌蔓延防止のためには、医療施設内のみならず地域医療連携による感染対策を行うことが重要である。

Key words: 誤嚥性肺炎患者, 口腔ケア, 地域医療連携

はじめに

肺炎は、わが国の死因の第4位を占めており、その死亡率は高齢者で高くなり、特に70歳以上では極めて高率となっている。また、65歳以上の肺炎患者のうち約4割が誤嚥性肺炎であり、その6割近くが80歳以上である¹⁾。誤嚥性肺炎に罹患した患者の多くは、急性期病院(急性増悪を含む発症間もない患者に対し集中的な医療を提供する病院)において、抗菌薬の投与による治療が実施され、臨床症状が軽快すると退院する。しかし、脳活動の低下や肺炎既往のある高齢者は、咳嗽・嚥

下反射の低下があるために再発しやすい²⁾。すなわち、加齢にともなう唾液分泌の減少³⁾、ADL低下による口腔内の不衛生、義歯の装着などが口腔内細菌のリザーバーとなり⁴⁾、肺炎に再度罹患する危険性が高い⁵⁾。また、高齢者の肺炎の多くは、睡眠中などに咽頭や歯周局所の口腔内細菌を無意識のうちに誤嚥する、いわゆる不顕性誤嚥によって起こり⁶⁾、それは繰り返して発症する⁵⁾。つまり、抗菌薬の投与により高齢者の肺炎は治療しても、生理的な機能低下により再罹患しやすい。

誤嚥性肺炎予防策として、要介護高齢者に対する口腔ケアを実施した結果、咽頭細菌叢の菌の検出率が低下し、肺炎が予防できたとの報告がある⁷⁻¹⁰⁾。また、介

岡山大学大学院 ¹⁾保健学研究科, ²⁾歯歯薬学総合研究科