

Fig. 5 – Schematic computer model of the substituted peptides, SspB (390–T400K–402) and truncated SspB (390–T400K–402) peptides. Model of the secondary structure and surface charges (positive [blue] and negative [red]) in the peptides were constructed by using the MOE software with chemical computing graphics. Some of the amino acid residues on the surface of the peptides are indicated.

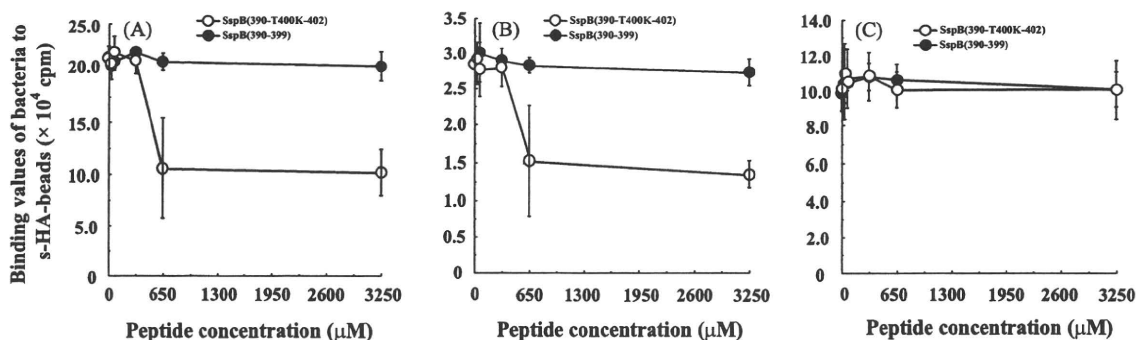


Fig. 6 – Inhibition using SspB (390–T400K–402) and SspB (390–T400K–401) peptides for streptococci adherence on s-HA. The adherence levels (cpm) of *S. gordonii* ATCC 10558 (A), *S. mutans* MT8148 (B) and *S. mitis* ATCC 6249 (C) to s-HA treated with 0.0, 32.5, 65.0, 325.0, 650.0 and 3,250.0 μM of SspB (390–T400K–402) or SspB (390–399) peptide are shown. The data are the means ± SD of three independent assays.

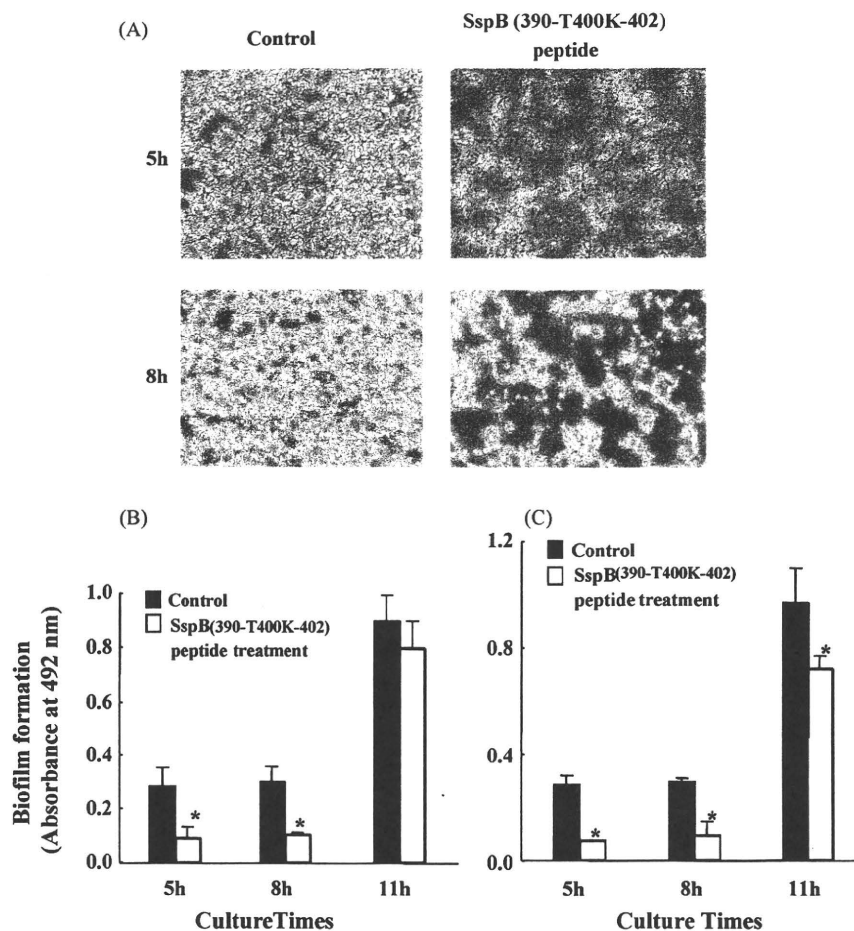
4.2. Effects of the SspB analogue peptide using the microtitre plate inhibition assay

We determined if SspB (390–T400K–402) inhibited adherence of *S. mutans* and influenced biofilm formation by *S. mutans* conditioned with 0.25% sucrose. The treatment with the

analogue peptide on the polystyrene plates before inoculation of *S. mutans* to the saliva-coated well did not inhibit biofilm formation at 6, 9, 12 and 16 h culture without withdrawing the planktonic cells (data not shown). However, after withdrawing the planktonic cells at 1 h, photographs shows binding at 5 and 8 h was inhibited by pre-treatment with 650 μM analogue peptide (Fig. 7A); and significant inhibition was confirmed using quantitative analysis in comparison to the control, a non-treated culture (Fig. 7B). At 650 μM analogue peptide, the biofilm formation after withdrawing planktonic cells at 1 h was significantly inhibited using *S. mutans*, when the plates were twice washed with sterile PBS, after the 5 and 8 h culture (Fig. 7C). The effect slowly diminished, where at 11 h the culture biofilm was not inhibited using pre-treatment with the SspB (390–T400K–402) peptide using no washing with PBS (Fig. 7B); and showed slight inhibition when twice washed

Table 2 – Association and dissociation rate constants of SspB peptides to immobilized salivary components.

SspB peptide	Association rate constants ( $K_a \times 10^4 M^{-1}$ )	Dissociation rate constants ( $K_d \times 10^{-5} M$ )
390-T400K-402	1.7 ± 0.9	8.7 ± 5.9
390-T400K-401	2.9 ± 1.1	3.8 ± 1.3



**Fig. 7 – Inhibition using SspB peptides of *S. mutans* biofilm formation on polystyrene surfaces.** The culture medium including planktonic cells of *S. mutans* MT8148 was removed from the polystyrene surface treated using 650  $\mu$ M SspB (390-T400K-402) peptide after 1 h culture of *S. mutans* MT8148. Photographs of biofilms formed by *S. mutans* MT8148 on the polystyrene surface of a 96-well microtitre plate coated with salivary components and treated with SspB (390-T400K-402) peptide at 5 and 8 h culture (40 $\times$ ) (A). Formed biofilms were stained using safranin and the absorbance was measured at 492 nm (B). After removing the culture medium, the wells were rinsed a second time with sterile PBS (C). Fresh medium was added and they were cultured for 5, 8 and 11 h. The data are expressed as the means  $\pm$  SD of triplicate assays. Asterisks show significantly different relative levels of biofilm formation ( $p < 0.05$  vs. control: non-treated and the saliva-coated polystyrene surface).

with sterile PBS (Fig. 7C). By 15 h, there was no significant inhibition of adherence by pre-treatment with the peptide (data not shown).

## 5. Discussion

Controlling dental plaque bacteria is important in the prevention and treatment of oral diseases. Recently, various types of anti-microbial peptides against oral bacteria derived from various sources have been suggested.<sup>26–30</sup> However, the tested peptides shown here have no bactericidal activity and/or cell growth enhancement or growth inhibition (Fig. 2). The constructed analogue peptide described here exhibits a significant binding to salivary components and has a preferential adherence inhibition for *S. mutans* and *S. goeodonii* on the salivary components-coated HA as compared to other

beneficial commensal streptococci such as *S. mitis* that were not inhibited. As *S. gordonii* and *S. mutans* likely compete for the same niche environment in the dental plaque biofilm, this capacity may allow *S. gordonii* to effectively win the interspecies competition with *S. mutans*.<sup>31</sup> Accordingly, *S. gordonii* and *S. mutans* may compete for salivary adhesion sites such as homologue SspB regions including SspB (390–402) and PAC (365–377).<sup>17</sup> Therefore, physical inhibition using the analogue peptide may potentially be useful in preventing the interaction between salivary components and the common adhesin area on *S. mutans* and *S. gordonii* surface proteins; and may play a role in preventing bacterial adherence and dental caries using a safe oral treatment without side-effects; whereas other peptides have direct effects such as bactericidal activity, killing both beneficial and pathogenic agents.

In previous studies, lysine inhibited whole saliva- and salivary agglutinin-mediated aggregation of both *S. mutans*

and *S. sanguinis*<sup>32</sup> as well as *S. mutans* adherence to an adhesion-promoting-coated hydroxyapatite.<sup>33</sup> Previous reports support our findings that in theory the lysine moiety has a role in the adherence inhibition of *S. mutans* and *S. gordonii*. Excess lysine alone inhibits *S. mutans* adherence; however at the same molarity, lysine alone does not inhibit adherence compared to the SspB (390–T400K–402) peptide, which shows significant inhibition (Fig. 3). Synthetically adding glutamine or glutamic acid, and glutamine and glutamic acid to the N or/and C-terminus at the lysine and other truncated peptides of the SspB (390–T400K–402), except for the SspB (390–T400K–401) peptide, did not increase binding to the salivary components and did not inhibit adherence (Fig. 4). This shows the leucine position 402 on the c-terminal side was not required for binding and inhibition. The responsible peptide adhering to the salivary receptors required the appropriate secondary structure with surface charges for adherence inhibition of *S. mutans* (Fig. 5). Recently, Daep et al. reported the SspB peptide (residues 1167–1193) containing positively charged amino acids at position 1182 or hydrophobic residues at position 1185 bound to *P. gingivalis* more efficiently than control peptides containing asparagine and valine at these positions.<sup>34</sup> The study suggested perturbation of the peptide secondary structure influences the adherence activity. Here we show a lack of aspartic acid at position 390 in the SspB (391–T400K–402) peptide did not inhibit the adherence of *S. mutans* to s-HA. Further, peptides substituted with positively charged amino acids at position 390 did not show significant inhibition. Aspartic acid at position 390 is a negatively charged amino acid showing negative and positive charged areas in the secondary structure of SspB (390–T400K–402) using chemical computing graphics (Fig. 5). The c-terminus neighbour of lysine at position 400 is glutamic acid having a negatively charged amino acid at position 401 in the SspB (390–T400K–402) peptide. The lack of glutamic acid at position 401 resulted in a marked loss of the inhibition activity for the peptide. Cheng et al.<sup>35</sup> suggests ion-pairing (positive and negative charged functional groups) interactions are important for protein stabilization. Therefore, we conclude the positive charges form durable interactions with negative charges in the analogue peptide. The structural and expressive difference in the surface protein charge in the active peptides may influence inhibition. Taken together, the two surface positive charges in connection with the negatively charged residues at position 390, 400 and 401, and the 12 amino acid sequence of 390–T400K–401 are required for the adherence inhibition of *S. mutans*. These new characteristic activities in amino acid sequence were found in addition to the required position of lysine previously observed by our laboratory.<sup>19</sup>

Biofilm formation at 5 and 8 h after culture re-start, *S. mutans* was inhibited with the peptide pre-treatment on saliva-coated polystyrene surfaces when the planktonic cells were removed after 1 h culture with the *S. mutans*. The biofilm formation at 5 and 8 h had log-phase biofilm growth.<sup>36</sup> We believe once the bacterial adherence is inhibited, biofilm formation could be immediately prevented. However, the inhibition effects were not shown with planktonic cells and were poor without planktonic cells in stationary phase biofilm growth (>11 h). Possibly, the planktonic cells adhered to polystyrene surfaces and was un-bound with the peptide

using synthesis of glucan in the medium containing sucrose because the synthesis of glucans is critical both for the adherence of the organisms to the tooth surfaces and for their accumulation and persistence.<sup>37</sup> Further, the planktonic cells reproduced increasing the developed biofilm where this may disturb the inhibition by the peptide during stationary phase biofilm growth. Therefore, biofilm formation in glycan inducing media including sucrose was limited to a short culture time (<8 h). However, if used regularly in routine home and clinically in the oral cavity, peptide therapy to prevent dental caries requires oral routine hygiene techniques to remove planktonic cells and the limitation of sugar diet intake.

After treatment using analogue SspB peptide, the commensal streptococci such as *S. mitis* which is the major bacteria in the oral cavity of healthy humans<sup>38</sup> may re-colonize immediately on the tooth surface to keep a healthy oral flora excluding *S. mutans*. Therefore, in conclusion, it may be possible to employ anti-adherence peptides in future routine therapies preventing oral infections. Thus as the oral cavity is readily accessible for regular local application to the tooth surface, oral hygiene with brushing and limitation of sugar diet intake may be particularly suitable for including this small peptide.

## Acknowledgement

The authors thank Hideo Yonezawa for his technical support, helpful discussions, and advice.

**Funding:** This work was supported in-part by a grant-in-aid for the Development of Scientific Research (15390571, 19659559 and 18592011) from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan; and by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (H16-Medical Services-014 and H19-Medical Services-007).

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

## REFERENCES

1. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1990;44:331–84.
2. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770–83.
3. Pearce C, Bowden GH, Evans M, Fitzsimmons SP, Johnson J, Sheridan MJ, et al. Identification of pioneer viridens streptococci in the oral cavity of human neonates. *J Med Microbiol* 1995;42:67–72.
4. Stinson MW, Safulko K, Levine MJ. Adherence of *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* to *Streptococcus sanguinis* in vitro. *Infect Immun* 1991;59:102–8.
5. Catalanutto FA, Shklair IL, Keene HJ. Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. *J Am Dent Assoc* 1975;91:606–9.
6. Demuth DR, Lammey MS, Huck M, Lally ET, Malamud D. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* receptors for human salivary agglutinin. *Microb Pathog* 1990;9:199–211.

7. Forester H, Hunter N, Knox KW. Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* 1983;129:2779–88.
8. Kelly C, Evans P, Bergmeier L, Lee SF, Progulsk-Fox A, Harris AC, et al. Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II. *FEBS Lett* 1989;258:127–32.
9. Russell MW, Mansson-Rahemtulla B. Interaction between surface protein antigens of *Streptococcus mutans* and human salivary components. *Oral Microbiol Immunol* 1989;4:106–11.
10. Goldstein EJ, Citron DM, Gonzalez H, Russell FE, Finegold SM. Bacteriology of rattlesnake venom and implications for therapy. *J Infect Dis* 1979;140:818–21.
11. Demuth DR, Golub EE, Malamud D. Streptococcal–host interactions. Structural and functional analysis of a *Streptococcus sanguis* receptor for a human salivary glycoprotein. *J Biol Chem* 1990;265:7120–6.
12. Russell MW, Lehner T. Characterisation of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. *Arch Oral Biol* 1978;23:7–15.
13. Senpuku H, Kato H, Todoroki M, Hanada N, Nisizawa T. Interaction of lysozyme with a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 1996;139:195–201.
14. Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada S, Koga T. Cloning of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol* 1989;3:221–8.
15. Senpuku H, Miyauchi T, Hanada N, Nisizawa T. An antigenic peptide inducing cross-reacting antibodies inhibiting the interaction of *Streptococcus mutans* PAC with human salivary components. *Infect Immun* 1995;63:4695–703.
16. Senpuku H, Matin K, Abdus SM, Kurauchi L, Sakurai S, Kawashima M, et al. Inhibitory effects of MoAbs against a surface protein antigen in real-time adherence in vitro and recolonization in vivo of *Streptococcus mutans*. *Scand J Immunol* 2001;54:109–16.
17. Hamada T, Kawashima M, Watanabe H, Tagami J, Senpuku H. Molecular interactions of surface protein peptides of *Streptococcus gordonii* with human salivary components. *Infect Immun* 2004;72:4819–26.
18. Bikker FJ, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC, van't Hof W, Bolscher JG, et al. Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *J Biol Chem* 2002;277:32109–15.
19. Koba H, Okuda K, Watanabe H, Tagami J, Senpuku H. Role of lysine in interaction between surface protein peptides of *Streptococcus goeoni* and agglutinin peptide. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:162–9.
20. Liljemark WF, Bloomquist CG, Germaine GR. Effect of bacterial aggregation on the adherence of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect Immun* 1981;31:935–41.
21. Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immun* 1990;58:289–96.
22. Arakawa T, Fujimaru T, Ishizaki T, Takeuchi H, Kageyama M, Ikemi T, et al. Unique functions of hydroxyapatite to adherence of mutans streptococci. *Quintessence Int* 2010;41:e11–9.
23. Motegi M, Takagi Y, Yonezawa H, Hanada N, Terajima J, Watanabe H, et al. Assessment of genes associated with *Streptococcus mutans* biofilm morphology. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:6277–87.
24. Halgren TA. Merck molecular force field. *J Comput Chem* 1996;17:490–519.
25. Rollins-Smith LA, Doersam JK, Longcore JE, Taylor SK, Shamblyn JC, Carrey C, et al. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Dev Comp Immunol* 2002;26:63–72.
26. Altman H, Steinberg D, Porat Y, Mor A, Fridman D, Friedman M, et al. In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. *J Antimicrob Chem* 2006;58:198–201.
27. Drobni M, Li T, Krüger C, Loimaranta V, Kilian M, Mammarrström L, et al. Host-derived pentapeptide affecting adhesion, proliferation, and local pH in biofilm communities composed of *Streptococcus* and *Actinomyces* species. *Infect Immun* 2006;74:6293–9.
28. Wei GX, Campagna AN, Bubek LA. Effect of MUC7 peptide on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chem* 2006;57:1100–9.
29. Björck L, Akesson P, Buhus M, Trojnar J, Abrahamson M, Olafsson I, et al. Bacterial growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor. *Nature* 1989;337:385–6.
30. Kelly CG, Younson JS, Hikmat BY, Todryk SM, Czisch M, Haris PI, et al. A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent. *Nat Biotechnol* 1999;17:42–7.
31. Kemp CW, Robrish SA, Curtis MA, Sharer SA, Bowen WH. Application of a competition model to the growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in binary continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 1983;45:1277–82.
32. Hajishengallis G, Koga T, Russell MW. Affinity and specificity of the interactions between *Streptococcus mutans* antigen I/II and salivary components. *J Dent Res* 1994;73:1493–502.
33. Kishimoto E, Hay DL, Gibbons RJ. Inhibition of adhesion-promoting activity of a human salivary protein which promotes adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett* 1991;69:19–22.
34. Daep CA, James DM, Lamont RJ, Demuth DR. Structural characterization of peptide-mediated inhibition of *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *Infect Immun* 2006;74:5756–62.
35. Cheng RP, Girinath P, Ahmad R. Effect of lysine side chain length on intra-helical glutamate-lysine ion pairing interactions. *Biochemistry* 2007;46:10528–37.
36. Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, et al. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2008;24:152–61.
37. Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1992;60:284–95.
38. Aas JA, Poster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721–32.

## 多剤性耐性菌アシネトバクター & NDM-1 の 歯科医療における感染防止対策

国立感染症研究所 細菌第一部 泉福英信

### ■はじめに

昨年発生した新型インフルエンザは、本年度8月になりWHO（世界保健機関）よりポストパンデミックが発表され、終息してきた。しかし、それにとって代わるようにこの夏、多剤耐性アシネトバクターやNDM-1産生多剤耐性菌の感染症が発生し、感染症の脅威は後を絶たない（図1）。記憶に新しいSARS、増え続けているHIV感染者、150万人はいるとされるHBV、HCV感染者等、医療従事者にとって、感染症の問題はクリアしていかなければならない重要課題である。

歯科医療にとって、このような新規感染症は、直接歯科疾患にかかわらないとしても、治療の際の患者との近接、唾液や血液の飛び散りなどから病原体に曝されるリスクが高いため、脅威に感じる歯科医師も多いだろう。しかし、一般歯科医院で行う歯科治療において、標準予防策（スタンダードプレコーション）が施されていれば、それ程脅威になることは少ない。

問題は、スタンダードプレコーションが行われていない点にある。筆者が研究代表者を務める厚生労働科学研究班の事業の成果において、某県の歯科医師会所属歯科医師対象の

アンケート調査では、スタンダードプレコーションの理解率は20%前後であり、これは回収率が約15%であることを考えると、全体はもっと低いことが予想される。

今回、緊急情報というタイトルで原稿を書くことになったが、この多剤耐性菌感染症の問題を契機に、今一度、各歯科医師がスタンダードプレコーションを導入する機会となることを望む次第である。

### ■アシネトバクターとは

土壌や河川水などの自然環境中に生息する環境菌で、健常人では普通無害である。がん末期、糖尿病などにより感染防御能力の低下した患者において尿路感染症、肺炎、敗血症、手術部位感染症の起因菌になり得る。欧米では、人工呼吸器関連肺炎の起因菌として10年前から警戒されるようになった。

アシネトバクター属菌は、グラム陰性桿菌で、湿潤環境を好むが乾燥にも強い（3週間生きる）。衣服、皮膚、人工呼吸器、流し台、ドアノブなどの環境中に長期に生存する。*Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*などの菌種が存在するが、現在耐性菌として問題に

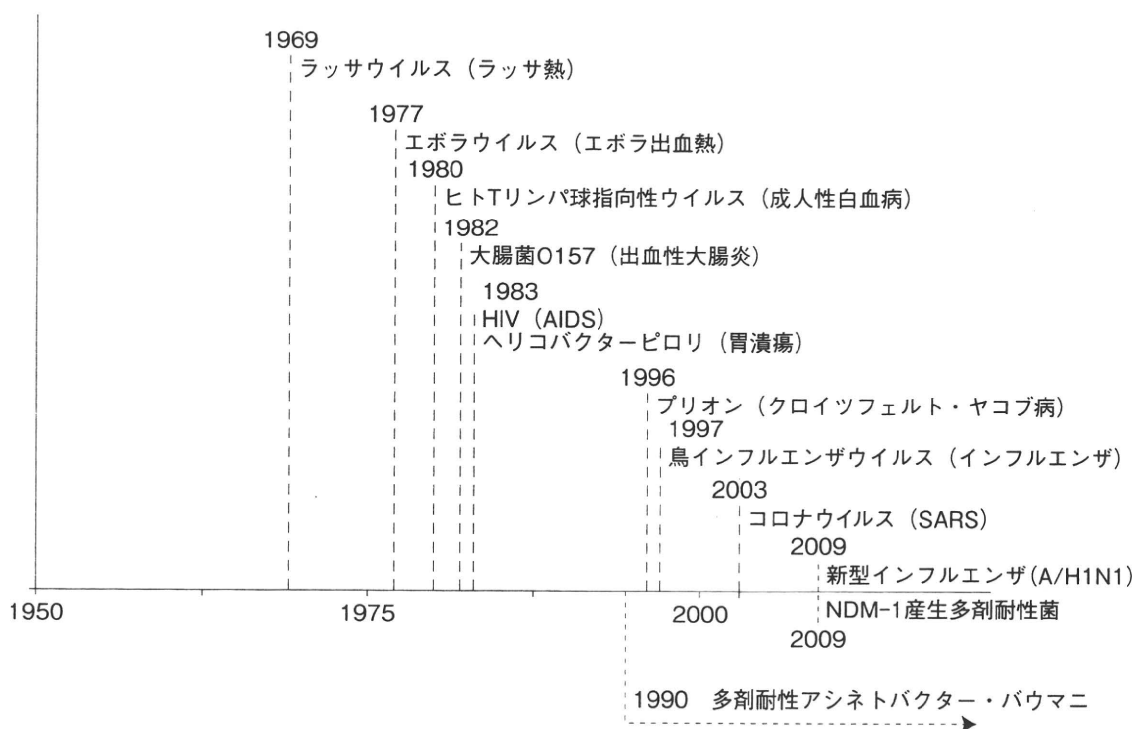


図1 近年同定された主な病原体の年表

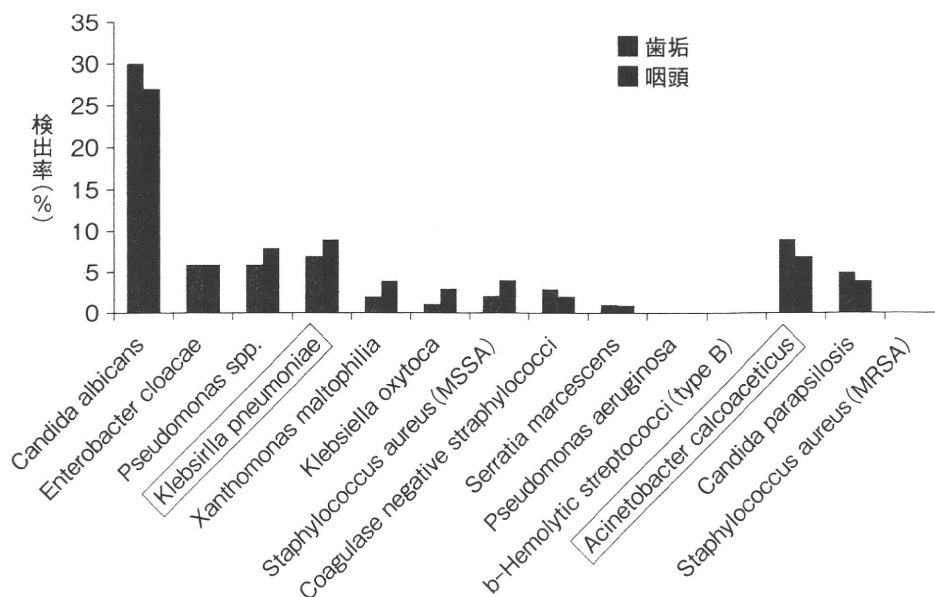
なっているのは *A. baumannii* (アシネトバクター・バウマニ) である。高齢者の口腔からも日和見菌として検出された報告がある(図2)。

### ■多剤耐性アシネトバクター

日本の定義では、カルバペネム系、フルオロキノロン系、アミノグコシド系の抗菌薬に耐性を示す株。その多くが *A. baumannii* である。遺伝子断片でも取りこみやすく、変異しやすい性質をもっているため、耐性遺伝子を獲得しやすい。アシネトバクターの多剤耐性化は、世界的にも最近20年くらいの間に急激に進んでいる。最近、日本で検出される多剤耐性アシネトバクターは、外国から流入してきた

菌株と考えられることが多い。

2010年9月22日のYahoo! ニュースでは、某医療機関で、全入院患者の多剤耐性アシネトバクター・バウマニの保菌状態を調べた結果、昨年1月以降、感染した患者が合計59人に上ったことが明らかになった。アシネトバクターが多剤耐性化したからといって、耐性化していないアシネトバクターと比べ病原性が向上したわけではない。一般健常者には無害であり、たとえ口腔に入ったとしても、感染症を引き起こすことはない。病院に入院している防御能力が低下した患者や人工呼吸器を装着した患者などに感染した場合、感染症を引き起こす原因となる。その場合、抗菌薬による効果がないから、治療が困難になる。



□に囲まれた菌は、肺炎桿菌 (*K. pneumoniae*) とアシネトバクター (*A. calcoaceticus*) である

図2 自立高齢者 (72±0.3歳) の口腔サンプルにおける日和見菌の検出率 (Senpuku et al.: Gerontology, 49: 301-309, 2003. より引用改変)

一般歯科医院の場合、感染防御力が低下した患者を治療するケースがなければ、それ程問題となることはない。しかし、その機会がないからといって完全に無視するわけにはいかない。いかなる感染症の患者が来院しても対応できるように、スタンダードプレコーションを確実にいき、患者と歯科医師の信頼関係を保つことが重要である。

### ■ NDM-1 (ニューデリーメタロ-β-ラクタマーゼ) を産生する多剤耐性菌とは

複数の抗菌薬に対する複数の耐性遺伝子を同時に保有しており、ほとんどの抗菌薬に耐性を示す。カルバペネムという切り札的抗菌薬を分解する NDM-1 という酵素を産生する。NDM-1 産生多剤耐性菌は、大腸菌、肺炎桿菌などの腸内細菌科の菌にみられる。日本で

は、2010年9月に第1例が報告された。

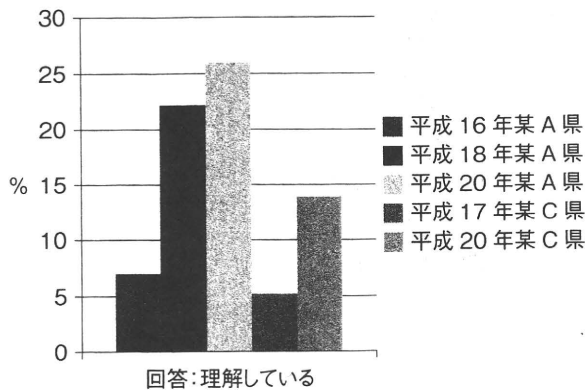
大腸菌や肺炎桿菌は、一般の健常者の腸内に生息する常在菌である。肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) は、高齢者の口腔でも分離される (図2)。

アシネトバクターと同様に大腸菌や肺炎桿菌も感染防御能力の低下した患者において、院内感染症や日和見感染症の原因になる。健常者では、腸内、口腔内に留まっているかぎり無害、無症状である。しかし、膀胱に感染すれば膀胱炎、肺に感染すれば肺炎、血中に感染すれば敗血症を発症し、耐性菌なので治療が困難になる。NDM-1 を産生する菌が、非産生菌よりも病原性が高いということはない。

### ■ 予防と対策

両耐性菌とも同様に、手洗い、手指消毒を

質問：スタンダードプリコーションまたはユニバーサルプリコーションとは何か知っていますか？



図③ 某A、某C県歯科医師会所属歯科医師に対するアンケート調査の結果

徹底することを基本とし、流し台などの水回り環境、歯科ユニット、医療器具などの清掃、消毒を徹底する。現場スタッフによる環境の清掃・消毒に関して管理表を導入することが効果的である。次亜鉛素酸ナトリウム製剤(1w/v%)や消毒用エタノール(76～81%)による消毒が効果的である。

エプロン、マスク、帽子、紙コップ等、できるかぎりディスプレイ化し、使用后廃棄をする。防護用メガネを使用する。歯科用器材は洗浄後、オートクレーブにて滅菌する。

飛び散りのリスクを減らすために、口外バキュームの設置、器具の整理整頓、患者ごとのタービンヘッドの交換、歯科ユニット間のパーティションの設置等、スタンダードプリコーションに必要な項目についてクリアしていく。

## ■他の多剤耐性菌

多剤耐性菌は、アシネトバクターや大腸菌だけでなく、MRSAなどの黄色ブドウ球菌、腸球菌、肺炎球菌、緑膿菌などにもみられ、今後いかなる多剤耐性菌感染症が起こったとしても対応できる体制作りをしなければならぬ。

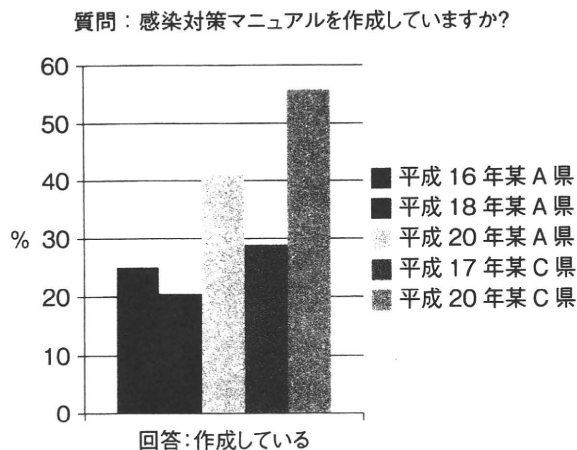
## ■歯科医療における院内感染対策の導入についての研究成果

歯科医療における院内感染対策の導入については、厚生労働科学研究班が平成16年から始め、今年で7年目を迎えようとしている。その間に、平成19年には医療法の一部が改正され、歯科診療所における院内感染制御体制の整備が求められるようになった。更に、平成20年度の診療報酬改定では、歯科外来診療環境体制加算が新設された。歯科医師国家試験においても、スタンダードプリコーションが出題されるようになった。

このような状況を踏まえ、多くの関係機関で研修会が開催され、また関連本も出版されるようになった。研究班の成果では、某A県、某C県歯科医師会所属歯科医師に対するアンケート調査結果において、平成16、17年～20年にかけて、スタンダードプリコーションの理解率が2倍以上(図3)、自院による感染対策マニュアル作成や感染対策に関するスタッフへの教育率も約2倍上昇していることが明らかとなった(図4、5)。少しずつであるが、歯科医療において院内感染対策が導入される傾向にあると考えている。

しかし、口外バキュームの設置や患者ごとのタービンヘッドの交換は、若干の上昇に止





図④ 某A、某C県歯科医師会所属歯科医師に対するアンケート調査の結果

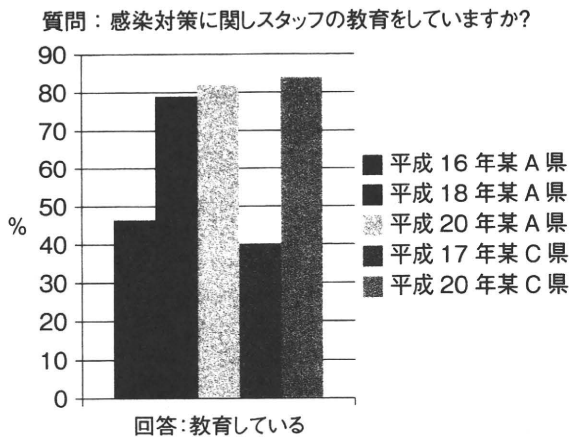
まっている (図6)。これは、分析の結果、一部の歯科医師に対する院内感染対策の導入に関して一定の効果がみられるものの、地域、年齢、収入格差に左右されているのが原因と考えられ、院内感染対策達成はまだまだ不十分のままであった。一律に院内感染対策を導入していくためには、導入しやすい標準化された指標を作成し、それを普及させるシステムを構築する必要がある。

### ■おわりに

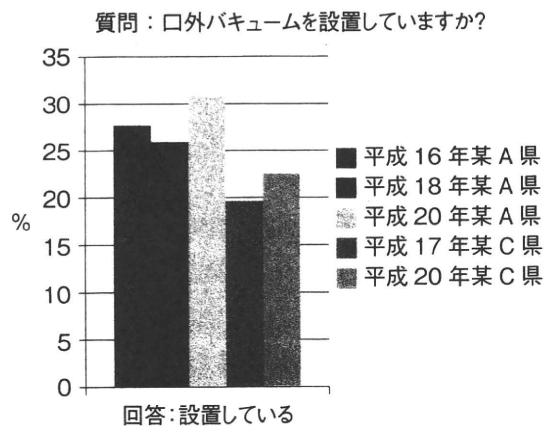
多剤耐性菌が出現した理由は、近年の抗菌薬の乱用に起因しているのではないかと考える。科学、医療の進歩とともに微生物も進化しているのである。このイタチごっこは、永年続くかもしれない。その進化に触発されて、歯科医療における院内感染対策も成熟していくことを期待している。

#### 【参考文献】

1) 米国 CDC のホームページ : <http://www.cdc.gov/ncidod/dhap>



図⑤ 某A、某C県歯科医師会所属歯科医師に対するアンケート調査の結果



図⑥ 某A、某C県歯科医師会所属歯科医師に対するアンケート調査の結果

- 2) 英国 HPA のホームページ : <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases>
- 3) 国立感染症研究所 IASR のホームページ : <http://www.nih.go.jp/iasr>
- 4) 厚生労働省のホームページ : <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou19>
- 5) 厚生労働科学研究費補助金 (医療技術評価総合研究事業) : 歯科医療における院内感染防止システムの開発 ; 平成16年~平成18年度総合研究報告書.
- 6) 厚生労働科学研究費補助金 (地域医療基盤開発推進研究事業) : 歯科医療における院内感染対策の評価指標の開発と有効性の検証 ; 平成19年~平成21年度総合研究報告書.

臨床医学編

## 2. 泌尿器感染症とバイオフィーム

狩山 玲子\*<sup>1)</sup> 公文 裕巳\*<sup>2)</sup>

尿路バイオフィーム感染症は症状の乏しい慢性持続感染症であり、個々の患者においては共生可能な病態である。しかし、長期の尿路カテーテル留置は細菌バイオフィーム形成の場となり、耐性菌の病院内での定着と交差感染の主たる感染源となっている。その対策は、単に泌尿器科病棟だけでなく、院内全体の課題であり、尿路バイオフィーム感染症を基礎的・臨床的に解析し、その制御を目的とした予防的視点からの研究を遂行することの意義はきわめて大きい。筆者らの検討において、緑膿菌性尿路バイオフィーム感染症に対するクオラムセンシング阻害剤の有用性ならびに抗菌薬との併用による新規治療法の可能性を示唆する成績が得られた。クオラムセンシング阻害剤の開発は、尿路バイオフィーム対策への活路を拓くものとして期待される。

**Key Words** : バイオフィーム/尿路カテーテル/難治性感染症/院内感染/  
クオラムセンシング阻害剤

### I はじめに

尿路バイオフィーム感染症は、細菌がバイオフィームを形成して抗菌薬や生体の感染防御系から免れることにより、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) や多剤耐性緑膿菌による広範な院内感染症の元凶となることが判明して久しい<sup>1) 2)</sup>。いまだその予防法・治療法は確立されておらず、ブレイクスルーが求められている<sup>3)~6)</sup>。今日の院内多剤耐性菌は、“いわゆる重症例や意識障害患者、ならびに血液がんをはじめとする、がん化学療法施行時における全身管理の一環として頻用される尿路留置カテーテル”と“カルバペネムや新世代セ

フェム剤の投与 (多くは尿路感染症治療の目的でないもの)”によって無意識のうちに誘導され、交差感染として蔓延している例が少なくない。

そのような背景の中で、バイオフィーム感染症対策を含めて、クオラムセンシング阻害剤の開発が感染症治療のブレイクスルーとして世界的に注目されている。国内外の最新の知見に基づき、抗バイオフィーム剤の探索に取り組む意義はきわめて大きい<sup>7)~10)</sup>。

### II 尿路感染症

#### 1. 尿路感染症の分類

尿路感染症は、細菌感染症の中でもっとも頻度の高い感染症である。感染の部位により腎盂腎炎

#### Urologic infections and biofilms

\*岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学 <sup>1)</sup>助教 Reiko Kariyama <sup>2)</sup>教授 Hiromi Kumon

(1815) 71

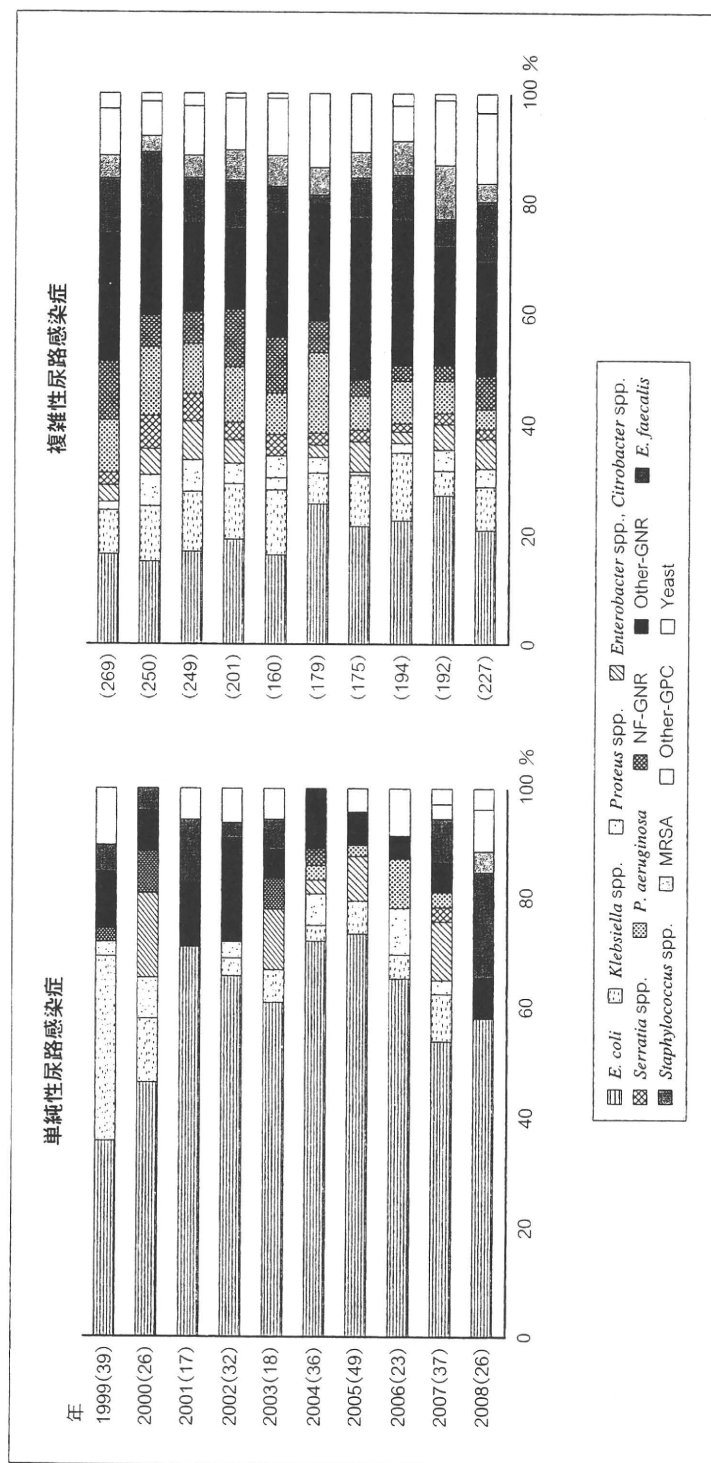


図1 尿路感染症分離菌の年次推移 (岡山大学病院泌尿器科, 1999～2008年)

岡山大学病院泌尿器科における最近10年間の調査において、2007年以降、グラム陽性球菌の分離頻度が上昇傾向にあることが明らかとなった。尿路に基礎疾患のない単純性尿路感染症では従来、グラム陰性桿菌の占める割合は70%を超えていたが、2008年にはグラム陽性球菌が原因菌全体の約40%を占めた。一方、尿路に基礎疾患（悪性腫瘍、前立腺肥大症、神経因性膀胱、尿路奇形、尿路結石など）を有する複雑性尿路感染症では、2007年以降、グラム陽性球菌が原因菌全体の約半数を占めるようになった。

*E. coli* : *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*, NF-GNR : ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌, Other-GNR : その他のグラム陰性桿菌  
*E. faecalis* : *Enterococcus faecalis*, MRSA : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, Other-GPC : その他のグラム陽性球菌, Yeast : 酵母

(筆者ら作成)

(上部尿路)と膀胱炎(下部尿路), その臨床経過により急性と慢性, その発症にかかわる基礎疾患(悪性腫瘍, 前立腺肥大症, 神経因性膀胱, 尿路奇形, 尿路結石など)の有無により単純性と複雑性に分類される。通常, 単純性の場合には急性, 複雑性の場合には慢性の臨床経過をとることが多い。

2. 尿路感染症原因菌

一般的に, 尿路感染症の原因菌はグラム陰性桿菌, 特に腸内細菌科に属する細菌による内因性感染が多くを占める。その他に, 外因性感染として緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ならびにその他のブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌 (NF-GNR), およびブドウ球菌などのグラム陽性球菌が原因菌となる。ところが, 図1に示したように, 岡山大学

病院泌尿器科における最近10年間(1999~2008年)の調査において, 2007年以降, グラム陽性菌の分離頻度が上昇傾向にあることが明らかとなった。単純性尿路感染症では, 2008年にグラム陽性球菌が原因菌全体の約40%を占め, MRSAの分離症例を認めた。複雑性尿路感染症では, 2007年以降, グラム陽性球菌が原因菌全体の約半数を占め, 腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) は15~18%であった。

通常, 尿路は尿流と周期的排尿に加え, 尿路上皮粘膜バリアの存在により, 比較的強力な感染防御能を有する。単純性尿路感染症においては, これらの防御能に抗して尿路に付着・定着するという細菌側の因子が感染成立の必要条件となり, 尿

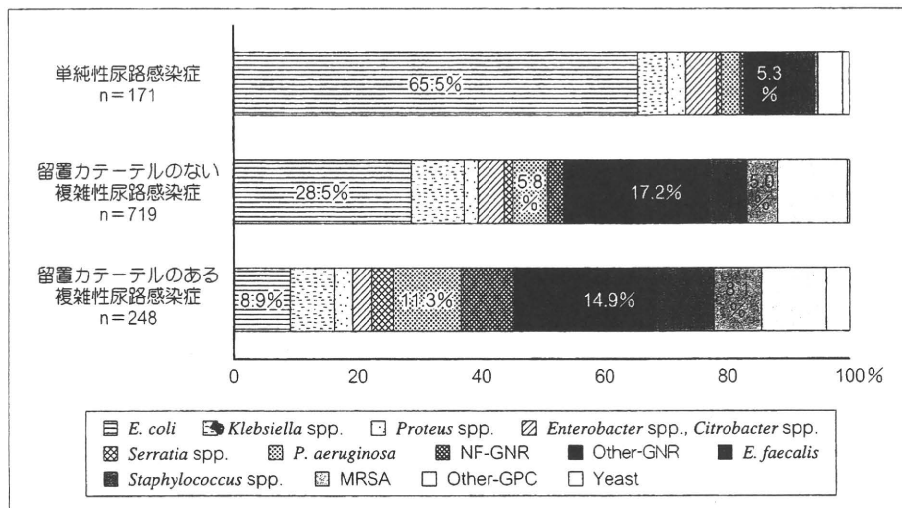


図2 尿路感染症における病態別原因菌分布(岡山大学病院泌尿器科, 2004~2008年)

単純性尿路感染症の原因菌は, その大半が大腸菌で占められている。複雑性尿路感染症における菌種の分布については, 単純性とは大きく異なり, 大腸菌の頻度が減少して, 全体としてきわめて多彩な分布を示している。また, カテーテル留置の有無によって原因菌分布はかなり異なっている。

*E. coli*: *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*

NF-GNR: ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌, Other-GNR: その他のグラム陰性桿菌

*E. faecalis*: *Enterococcus faecalis*, MRSA: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

Other-GPC: その他のグラム陽性球菌, Yeast: 酵母

(筆者ら作成)

MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)

NF-GNR (ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌)

特集● バイオフィーム形成とクオラムセンシング

路上皮細胞に対する特異的付着因子(アドヘジン)を保有する尿路病原性細菌がその主要原因菌となる。図2に示したように、大腸菌 (*Escherichia coli*) が原因菌全体の65.5%を占め、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) と *Proteus mirabilis* などに加え、グラム陰性桿菌で約80%程度となっている。

一方、複雑性尿路感染症においては、*E. coli* の分離頻度が減少し、同じ腸内細菌科の菌種である *Klebsiella* spp. などのほかに、*P. aeruginosa* とその他のNF-GNR、グラム陽性菌では *E. faecalis*, *Staphylococcus* spp. の分離頻度が高くなり、全体としてきわめて多彩な分布を示している。また、MRSAなどの耐性菌が分離されるのが特徴である。さらに、複雑性尿路感染症の中でもカテーテル留置症例での原因菌分布はかなり異なっており、緑膿菌が高頻度に分離される。このように、病態が複雑化するにつれて菌種の多様化が進み、

弱毒菌や耐性菌の分離頻度が増加する。このことは、カテーテルや結石などの尿路内異物の存在とそれにともなう粘膜バリアの破綻に起因する感染防御能の低下が直接の因子として、弱毒菌や耐性菌の尿路への進入と付着・定着に関与することを意味している。

III 尿路バイオフィーム感染症 (図3)

1. 尿路感染症原因菌のバイオフィーム形成能

一般に、細菌感染症は宿主と病原性細菌との相互関係において成立するものである。特に尿路感染症では、宿主側因子として全身性因子よりも局所性因子の関与が大きい。正常の尿路は、非特異的な疎水性相互反応を阻止しうる粘膜バリアを保持しており、細菌バイオフィームが形成される可能性はない。

尿路バイオフィーム感染症の代表例は、留置カ

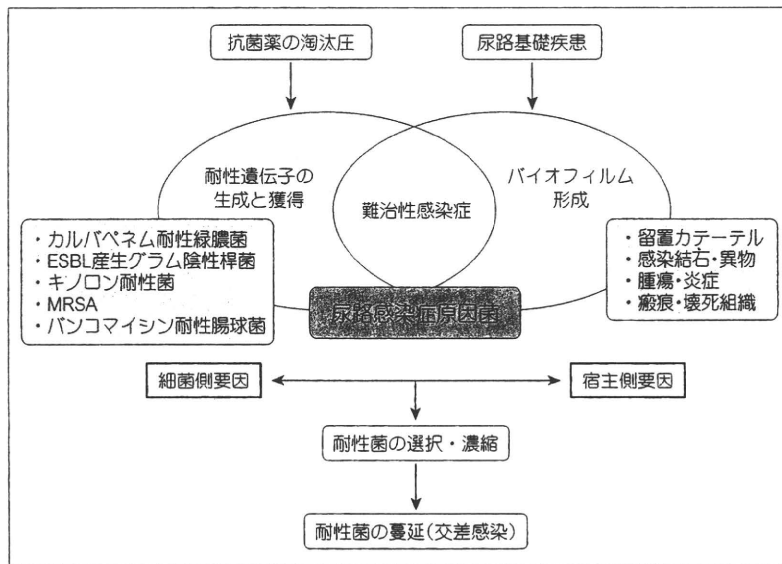


図3 尿路バイオフィーム感染症の概要

一般に、細菌感染症は宿主と病原性細菌との相互関係において成立するが、尿路バイオフィーム感染症は留置カテーテルや結石などの尿路内異物が関与することが多い。尿路バイオフィーム感染症に関しては、難治性感染症・院内感染症・耐性菌感染症としての観点から総合的に理解した上で、それらの問題点への対策を講じる必要がある。

ESBL：基質拡張型β-ラクタマーゼ，MRSA：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌  
(筆者ら作成)

テーテルや結石などの尿路内異物が関与する複雑性尿路感染症である。長期に留置された尿路カテーテルの表面にはきわめて多種類の細菌によるバイオフィームが形成され、複数菌種からなるバイオフィームであることも少なくない。バイオフィーム形成能自体は、尿中分離菌のほぼすべての細菌に認められる普遍的性状であるが、菌種・菌株によってその能力に差があることもまた事実であり、臨床的には、病態と原因菌のあいだにある程度の相関を認める。全体として、その分離頻度、難治性、急性増悪時における重症度という観点から、緑膿菌がもっとも問題となる。緑膿菌は、その優れた環境適応能力として菌体外多糖（グリコカリックス）を産生し、この菌体外多糖によりさらに強固に付着してバイオフィームを形成する。大腸菌が尿路においてバイオフィームを形成する事実は、Andersonらにより報告された<sup>11)</sup>。また、大腸菌を原因菌としたカテーテル関連尿路感染症は、その感染成立の機序においてバイオフィームの形成が重要な役割を果たしている<sup>12)</sup>。

宿主側因子としての難治性の基礎疾患は、付着・定着・侵入性という特異的な病原因子を保有していない“いわゆる弱毒菌”や、本来、尿路への病原性が強くない黄色ブドウ球菌や腸球菌などの尿路への侵入と定着を可能とする。尿路の留置カテーテル表面に腸球菌と緑膿菌とによる複数菌バイオフィームが認められるケースは多く、MRSAも腸球菌や緑膿菌との複数菌バイオフィームを形成する。

## 2. 難治性感染症としての位置づけ

尿路に留置されるカテーテルをはじめとする尿路異物（尿路結石を含む）表面は、疎水性相互反応によるバイオフィーム形成の場となる。同様に、尿流障害をともなう複雑性尿路感染症の経過の中で、炎症に起因する粘膜バリアの欠損を生じた場合、ならびに内視鏡手術や尿路腫瘍によって尿路粘膜面に癒痕や壊死組織が形成されている場合には、細菌は非特異的吸着を足掛かりにバイオフィームを形成することになる。その結果、主として尿中増殖力に応じて、非特異性細菌感染症としての種々の複雑性尿路感染症が成立することとな

る。一般に、この複雑性尿路感染症の難治性を左右する因子としては、細菌側因子よりもむしろ尿路の基礎疾患の種類とその程度の方が重要である。しかしながら、これらの基礎疾患を背景として尿路感染症が慢性化する過程において、バイオフィーム形成能の高い細菌が選択されて尿路内にバイオフィームが形成されると、最終的に抗菌薬不応性の慢性持続感染症としてのバイオフィーム感染症が成立する。

尿路バイオフィーム感染症は、潜伏・持続感染の様相を呈することが多く、難治性である。反復かつ遷延する尿路バイオフィーム感染症に対して抗菌化学療法をくり返すことによって、多剤耐性菌が選択されていることも事実である。

## 3. 院内感染症としての位置づけ

長期の尿路カテーテル留置症例を含む尿路バイオフィーム感染症の持続は、種々の要因が加わり、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。尿路感染症は院内感染の30～40%を占めていることから、尿路バイオフィーム感染症対策は、単に泌尿器科病棟だけでなく院内全体の課題となる<sup>2)</sup>。バイオフィーム形成能が高い細菌は、環境中に長期に生息し、プラスミド性遺伝子の伝達により耐性を獲得している可能性がある<sup>13)</sup>。耐性遺伝子の伝播・拡散防止のためには、バイオフィームを形成させないための医療・療養環境の管理が重要である。

宿主においては、感染の急性増悪が最大の問題である。尿路バイオフィーム感染症では、カテーテル閉塞や結石の嵌頓などにより尿流障害が生じると、尿路内圧が急激に上昇し、細菌は機械的に腎実質および血中に侵入する。結果として、尿性敗血症を含む重症感染症を引き起こす。原因菌が多剤耐性の場合も少なくなく、特に免疫抑制宿主では適切な治療法が選択されないと重篤化する。

## 4. 耐性菌感染症としての位置づけ

生体のバイオフィームは抗菌薬に不応性の病態であることから、①耐性菌感染症であることに変わりないこと、②臨床的に問題となる細菌バイオフィームが、そもそも耐性遺伝子を保有する、いわゆる耐性菌であることが少なくないこと、さら

(1819) 75

には、③細菌バイオフィームが耐性菌の院内での定着と交差感染の元凶であると推定されることから、バイオフィーム感染症は耐性菌感染症そのものであると言える。細菌バイオフィームは薬剤耐性遺伝子が直接的には関与しない多剤耐性化機構も加わることになり、きわめて複雑な様相を呈することとなる。

近年、尿路カテーテル留置患者の尿からのカルバペネム耐性（メタロ-β-ラクタマーゼ産生）緑膿菌や基質拡張型β-ラクタマーゼ産生（extended-spectrum β-lactamases：ESBL）大腸菌の分離頻度が増加傾向にある。これらの多剤耐性菌が保有する耐性遺伝子はプラスミド上にコードされていることが多く、菌株・菌種間を伝達することにより、耐性遺伝子が拡散する<sup>14)</sup>。メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌は、ほぼすべての抗菌薬に高度耐性を示す傾向が強く、現時点でもっとも監視が必要とされている日和見感染の原因菌である。わが国での分離頻度は低いが、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）も薬剤耐性遺伝子がプラスミド上にコードされていることが多く、監視が必要である。

#### IV 尿路バイオフィーム感染症の治療

尿路バイオフィー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にならない患者では、やむを得ず、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きわめて高い。

#### V 尿路バイオフィーム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

岡山大学泌尿器病態学分野においては、尿路バイオフィーム感染症に対する治療法および予防法の確立を目的として、長年にわたり *in vitro* および *in vivo* 実験モデル系の基盤技術を開発（改良）してきた<sup>15) 16)</sup>。

##### 1. 新規 *in vitro* 実験モデル系の開発

2002年に *in vitro* バイオフィーム実験モデル系として導入したキャピラリーフローセルシステムは、過去数年間に格段の進化を遂げた。本実験系は GFP（green fluorescent protein）産生株がキャピラリー中に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（タイムラプス）に観察して、抗バイオフィーム剤の評価を行う時にもっとも威力を発揮する。現在使用している実験系は再現性があり、阻害候補化合物の評価に使用している。

上記のキャピラリーフローセルシステムで確立した方法に基づいて、2008年にはバイオフィーム形成阻害剤を効率的にスクリーニングするための新規マイクロデバイスの開発に着手した<sup>17)</sup>。デバイスは顕微鏡のステージに搭載可能なサイズで、多種類の薬剤の効果が評価できることをコンセプトとして設計を行った。設計の改良を重ねた結果、バイオフィーム形成阻害剤を効率的にスクリーニング可能なデバイスの基本設計がほぼ完成に近づいた。このデバイスを用いて、バイオフィーム感染症に有効な新規化合物ならびに各種阻害候補化合物の併用効果をスクリーニングすることが可能である。

##### 2. 抗バイオフィーム剤の探索

本特集の基礎編で言及があったように、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オラムセンシング機構の研究が進展しており、その阻害剤の開発研究がなされてい

ESBL (extended-spectrum β-lactamases；基質拡張型β-ラクタマーゼ産生)

VRE (バンコマイシン耐性腸球菌)

GFP (green fluorescent protein)

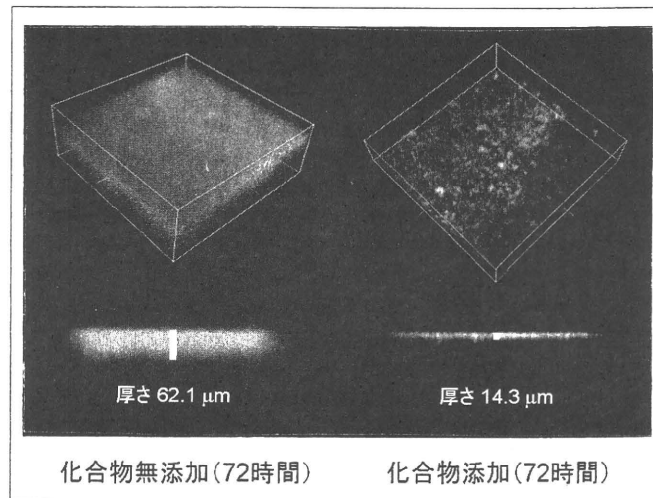


図4 緑膿菌におけるクオラムセンシング阻害剤のバイオフィーム形成阻害効果（人工尿中）

バイオフィーム実験モデル系であるキャピラリーフローセルシステムを用い、GFP産生緑膿菌がキャピラリー中に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観察し、画像解析ソフトウェアで3次元像を構築した。緑膿菌におけるクオラムセンシング阻害剤として見出された化合物の中に、人工尿中、バイオフィーム形成阻害効果を顕著に示す化合物を見出した。

GFP : green fluorescent protein

(筆者ら作成)

る。クオラムセンシングは病原性遺伝子の発現をコントロールするだけでなく、バイオフィーム形成にも関与している。Sticklerらは、患者の尿路カテーテルよりオートインデューサーであるホモセリンラクトンが検出されることを報告しており<sup>18)</sup>、尿路カテーテル留置症例におけるバイオフィーム形成に対しても、クオラムセンシング阻害剤の適応が期待できる。

筆者らは、上記のスクリーニング用新規マイクロデバイスならびにキャピラリーフローセルシステムを使用して、緑膿菌性バイオフィームに対する阻害候補化合物の評価を行った。緑膿菌におけるクオラムセンシング阻害剤として合成された数種の化合物が<sup>19) 20)</sup>、人工尿中、緑膿菌性バイオフィームに対して阻害効果を示すことを見出しており、尿路における抗バイオフィーム剤としての有用性が示唆された(図4)。また、クオラムセン

シング阻害剤と抗菌薬との併用により、バイオフィーム形成阻害効果が<sup>3)</sup>増強したことから、新規治療法の可能性を示唆する成績であると考えている。

## VI おわりに

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り、宿主との共生も可能である。しかし、長期の尿路カテーテル留置症例をはじめとす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。つまり、尿流動態の悪化にともな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こと、その慢性期においては院内感染に深く関与していることである。尿路バイオフィーム感染症に対する正しい理解に基づいて抗菌薬を

(1821) 77



## 特集● バイオフィーム形成とクオラムセンシング

適正使用することは、耐性菌の出現や耐性遺伝子の伝達を阻止し、多剤耐性菌の蔓延を防止することにつながる。また、院内感染対策においては、徹底した標準予防策の実施とバイオフィームを形成させないための医療・療養環境の管理が重要である。

近年、バイオフィーム研究は急速に進展しており、尿路バイオフィーム感染症の予防と制御のための新しい治療法・医用材料・抗バイオフィーム剤の今後の開発に大いに期待したい。筆者らは、先駆的なリアルタイム *in vitro* および *in vivo* のバイオフィーム実験モデル系を確立することにより、標的医療としての抗バイオフィーム療法を開発することを目指している。

## 文 献

- 1) Kumon H : Pathogenesis and management of bacterial biofilms in the urinary tract. *J Infect Chemother* **2** : 18-28, 1996
- 2) 門田晃一, 公文裕巳 : 尿路バイオフィーム感染症の課題と展望. *日治療誌* **51** : 426-430, 2003
- 3) Hall-Stoodley L, et al : Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2** : 95-108, 2004
- 4) Donlan RM, Costerton JW : Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15** : 167-193, 2002
- 5) Costerton JW, Stewart PS : Battling biofilms. *Sci Am* **285** : 74-81, 2001
- 6) Davey ME, O'Toole GA : Microbial biofilms : from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64** : 847-867, 2000
- 7) Bjarnsholt T, et al : Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Rev Mol Med* **12** : e11, 2010
- 8) Hall-Stoodley L, Stoodley P : Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11** : 1034-1043, 2009
- 9) Karatan E, Watnick P : Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73** : 310-347, 2009
- 10) Justice SS, et al : Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol* **6** : 162-168, 2008
- 11) Anderson GG, et al : Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301** : 105-107, 2003
- 12) Jacobsen SM, et al : Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* **21** : 26-59, 2008
- 13) Donlan RM : Biofilms : microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8** : 881-890, 2002
- 14) 山本満寿美ほか : 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および *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子の伝達性に関する検討. *Bacterial Adherence & Biofilm* **23** : 71-75, 2009
- 15) 狩山玲子ほか : 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. *緑膿菌感染研究会講記録* **41** : 39-43, 2007
- 16) 狩山玲子ほか : 緑膿菌性尿路バイオフィーム *in vivo* 感染症モデルへのリアルタイムイメージング装置の応用性に関する検討. *緑膿菌感染研究会講記録* **44** : (印刷中)
- 17) 金原和秀, 公文裕巳 : バイオフィーム研究における基盤技術の開発. *水環境学会誌* **33** (A) : 100-105, 2010
- 18) Stickler DJ, et al : Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol* **64** : 3486-3490, 1998
- 19) Suga H, Smith KM : Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol* **7** : 586-591, 2003
- 20) 菅裕明, 五十嵐潤 : Quorum-sensing 阻害剤による緑膿菌バイオフィーム形成阻害と剥離. *緑膿菌感染研究会講記録* **41** : 3-8, 2007

## Prognosis of Periodontitis Recurrence After Intensive Periodontal Treatment Using Examination of Serum IgG Antibody Titer Against Periodontal Bacteria

Noriko Sugi,<sup>1</sup> Koji Naruishi,<sup>1</sup> Chieko Kudo,<sup>1</sup> Aya Hisaeda-Kako,<sup>1</sup> Takayuki Kono,<sup>2</sup> Hiroshi Maeda,<sup>1</sup> and Shogo Takashiba<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan

<sup>2</sup>Department of Comprehensive Dentistry, Okayama University Hospital of Medicine and Dentistry, Okayama, Japan

Chronic periodontitis is associated with systemic diseases such as atherosclerosis. In this study, we evaluated the efficacy of serum IgG antibody titer to periodontal bacteria for prognosis of periodontitis recurrence during supportive periodontal therapy (SPT) phase. The 139 patients during SPT phase were selected and divided to two groups as follows: "Stable" and "Recurrence" group at SPT phase for case-control study: "High IgG titer" and "Normal IgG titer" group before transition to SPT phase for cohort study. We examined whether clinical findings or serum IgG antibody titers to periodontal bacteria are risk factors for the development of periodontitis recurrence. Case-control study showed that

there were significant differences between the stable and recurrence groups in age and number of teeth. The serum IgG antibody titer to *Eikenella corrodens* FDC1073, *Porphyromonas gingivalis* SU63, and *Campylobacter rectus* ATCC33238 was significantly higher in the recurrence group. Next, we found, that the recurrence ratio in the high IgG titer group to Gram-negative obligate anaerobe, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, and *C. rectus* was significantly higher than that of the normal IgG titer group. Taken together, serum IgG antibody titer test is useful in the prognosis of periodontitis recurrence during the SPT phase. J. Clin. Lab. Anal. 25:25–32, 2011.

© 2011 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** serum IgG antibody titer; periodontitis recurrence; supportive periodontal therapy

### INTRODUCTION

Chronic periodontitis is a polymicrobial infectious disease (1) and the disease may result in loss of teeth by inflammation-mediated bone resorption. More than 300 individual cultivable species of microbes have been identified in the human mouth (2,3). Recurrence of periodontitis caused by insufficient periodontal maintenance may lead to poor oral health, and result in tooth loss. Therefore, in order to prevent the recurrence of the disease after periodontal treatment, it is important to establish the efficient methods for prediction. Recently, many researchers have reported that chronic periodontitis resulting from persistent low-grade infection of Gram-negative bacteria is associated with increased atherosclerosis, diabetes mellitus, and other systemic diseases disseminated through blood stream (4,5).

Therefore, as the infection control is very important for general health, it should be evaluated by appropriate laboratory clinical tests focused on microbial infection.

Grant sponsor: Japan Society for the Promotion of Science; Grant number: A18209061; Grant sponsor: Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; Grant number: H19-Choju-008.

The current address of Noriko Sugi is Rakuwakai Oral Health Care Center, Meishin Kyoto-higashi-inter-yoko, Yamashina, Kyoto 607-8062, Japan.

\*Correspondence to: Shogo Takashiba, Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8525, Japan. E-mail: stakashi@cc.okayama-u.ac.jp

Received 22 November 2009; Accepted 7 March 2010

DOI 10.1002/jcla.20381

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

The microbiological examinations for periodontitis have been available to dental clinicians since the end of the 1980s (6). It has been generally accepted that infection with periodontal bacteria leads to humoral immunological responses and elevates the levels of serum IgG antibody to the bacteria (7,8). There are various reports regarding the usefulness of the serum IgG antibody titer against periodontal bacteria to evaluate the treatment effects for periodontitis (9,10). As serum IgG antibody levels correspond to the amount of periodontal bacteria, the effects of treatments focused on elimination of bacteria could be evaluated by decrease of serum IgG titer to the pathogens.

Supportive periodontal therapy (SPT) is an integral part of periodontal treatment, and is essential to prevent the recurrence of the disease in susceptible individuals, because periodontitis is frequently recurrent even after the intensive treatment (11). In general, clinically, several risk factors for the susceptibility of periodontitis recurrence are evaluated during the SPT phase, including: (i) the prevalence of residual periodontal pockets, (ii) tooth loss, (iii) the systemic conditions in each patient, and (iv) environmental or behavioral factors such as smoking (12). Basically, these factors should be considered and evaluated together for prognosis of periodontitis recurrence. Determining the risk for periodontitis recurrence during SPT phase would help the clinician to customize the frequency and contents of SPT visits. As chronic periodontitis is an infectious disease, it is important to evaluate the infection levels of periodontal pathogens. However, the current test for evaluating the level during SPT phase is not clinically useful, so establishment of convenient diagnosis system for the prognosis of periodontitis recurrence is needed.

In this study, we propose a new method for the prognosis of periodontitis recurrence during SPT phase using measurements of serum IgG antibody titer against periodontal pathogens. To show the clinical usefulness of serum IgG antibody titer for prognosis of the disease, we analyzed the relationship of several clinical data and serum IgG antibody titer to periodontitis recurrence during SPT. This examination will help to identify the most appropriate approach to SPT for individual patients to prevent the periodontitis recurrence. We believe our approach contributes to promotion of general health in the future.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

The subjects included 139 (male: 34, female: 105, average age:  $61.4 \pm 10.4$ ) chronic periodontitis patients at

the Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital of Medicine and Dentistry. The patients received intensive periodontal treatment followed by SPT for more than 1 year.

Informed consent was obtained from each subject, and the protocol for the evaluation of serum IgG titer has been approved by the institutional review board. The intensive periodontal treatment include scaling, root planning under infiltration anesthesia, and periodontal surgeries at one or more sites. SPT procedures included re-motivation, plaque control guidance, scaling and root planning, and removal of local environmental factors at intervals of a few months. Patients with systemic diseases such as diabetes were excluded from this study because of the elevated risk factors for periodontal diseases. A detailed breakdown of the criteria for inclusion and exclusion in this study is presented below.

### Inclusion Criteria

1. Adult patients with chronic periodontitis.
2. Patients with chronic periodontitis, treated by means of scaling and root planning and/or periodontal surgery, and in SPT phase for at least 1 year.
3. Patients systemically healthy, and without relevant chronic medication intake.

### Exclusion Criteria

1. Pregnant women or in lactation.
2. Systemic antibiotic intake. Frequent use of anti-inflammatory drugs.
3. Patients with systemic diseases.
4. Three or more periodontal pockets with  $\geq 6$  mm
5. Additionally, other habits, such as smoking, were recorded by a directed interview, as well as any relevant systemic condition or medication intake.

### Preparation of Bacterial Antigens

Ultrasonic extract antigens were used for antigen samples of periodontal bacteria. The bacteria were allowed to reach maturity in pure cultures, using agar plate and liquid media, and diluted with phosphate-buffered saline solution (PBS). After the bacterial cells were sonicated to destroy cellular membranes, each bacterial solution sonicated were centrifuged at 12,000g for 20 min to obtain the supernatants. These bacteria included: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, *A. actinomycetemcomitans* ATCC29523, *A. actinomycetemcomitans* SUNY67, *Capnocytophaga ochracea* S3, *Eikenella corrodens* FDC1073, *Fusobacterium nucleatum*

ATCC25586, *Prevotella intermedia* ATCC33563, *P. intermedia* ATCC25611, *Porphyromonas gingivalis* FDC381, *P. gingivalis* SU63, *Treponem denticola* ATCC35405, and *Campylobacter rectus* ATCC33238.

### Measurement of the Serum IgG Antibody Titer to Periodontal Bacteria

The levels of serum IgG antibody titer against periodontal bacteria were measured before transition to SPT phase, and once or twice a year during SPT phase.

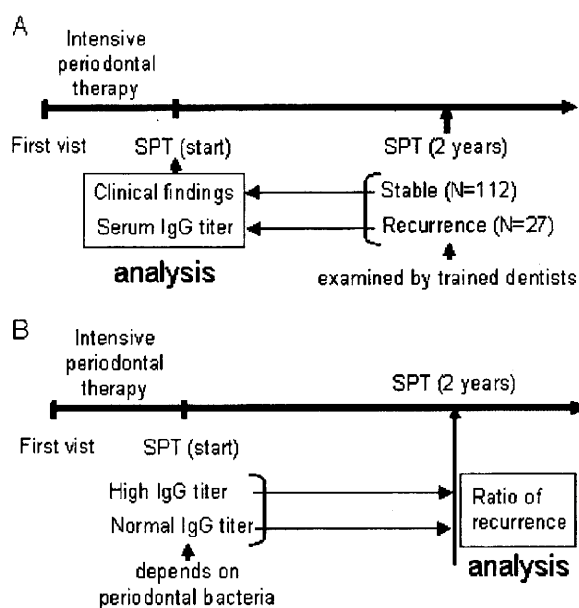
The amount of serum IgG that bound to each pathogenic bacteria antigen causing periodontitis was measured by ELISA as described previously (8). Briefly, each antigen was diluted to 10 µg/ml with 0.1M carbonate buffer (pH 9.6). A portion of this diluted solution (100 µl) was then added to each well in a flat-bottomed microtiter plate (Greiner Co., Ltd., Frickenhausen, Germany) and the plate was stored overnight at 4°C. Each well with immobilized antigen was washed three times with PBS (pH 7.4) containing 0.05% Tween-20 (PBST). Subsequently, a diluted serum sample (3,100-fold dilution with PBST) was added to each well. After incubation at 37°C for 2 hr, each well was washed three times with PBST and bound/free (B/F) separation was carried out. Next, a 100 µl portion of 1:5,000 diluted alkaline phosphatase-conjugated goat antihuman IgG antibody (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, MD) was added to each well. After incubation at 37°C for 2 hr, each well was washed three times with PBST and B/F separation was carried out. Thereafter, 50 µl of *p*-nitrophenyl phosphate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) adjusted to 1 mg/ml with 10% diethanolamine buffer (pH 9.8) was added to each well as substrate. The plate was then incubated at room temperature for 10–20 min. The enzymatic reaction was terminated by adding 50 µl of 3N NaOH and optical density (measurement at 405 nm; reference at 490 nm) was measured in a Micro ELISA Auto Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

The sera from ten healthy subjects (age: 20–29 yr) were pooled and used as the calibrator of analysis. Using serial dilutions (1:12.5, 1:50, 1:200, 1:800, 1:3,200, 1:12,800, and 1:51,200) of this pooled control plasma, standard titration curves were prepared. The absorbance of each sample after reaction was defined as ELISA unit (EU), so that 100 EU corresponds to 1:3,200 dilution of the calibrator sample. For clinical use, the following formula was applied to the EU to calculate the diagnostic standardized value: standardized value = (IgG titer of patient – mean IgG titer of healthy subjects) / 2 standard deviation (SD) determined by mean IgG titer of ten healthy subjects.

### Classification of Subjects and Statistical Analysis

At 2 years during SPT after periodontal healing, subjects were classified into a “Recurrence group” (with recurrence or progression of periodontitis) and a “Stable group” (without recurrence or progression of periodontal disease) for a case-control study (Fig. 1A). Patients with three or more deepening periodontal pockets with a depth of 3 mm or more after the transition to SPT phase were judged to be “with periodontitis recurrence or progression,” based on the report of Levine et al. (13). Trained dentists performed the examination of clinical findings (age, number of teeth, plaque control record (PCR), bleeding on probing (BOP), and periodontal pocket depth by pocket probing), and a supervisory doctor checked it so that there was no difference in technique among attending dentists. PCR was examined using O’Leary plaque index (14). Significant differences between each group were analyzed by Mann-Whitney *U*-test.

Secondly, subjects were classified into “High IgG titer” and “Normal IgG titer” group in serum IgG antibody titer against periodontal bacteria at the



**Fig. 1.** Experimental protocol (A) A case-control study. At 2 years during SPT after intensive periodontal treatment, subjects were classified into a “Recurrence group” (with recurrence or progression of periodontitis,  $N = 112$ ) and a “Stable group” (without recurrence or progression of periodontal disease,  $N = 27$ ). Significant differences between each group were analyzed by Mann-Whitney *U*-test. (B) A cohort study. At the beginning of the SPT phase, subjects were classified into “High serum IgG titer” and “Normal serum IgG titer” group in each strain of periodontal bacteria. Significant differences of periodontitis recurrence ratio within 2 years after intensive periodontal treatment between each group were analyzed by Pearson’s  $\chi^2$  test.