

4

口腔内細菌による病気

九州歯科大学 歯学部長

西原 達次

九州歯科大学感染分子生物学分野 助教

沖永 敏則

九州歯科大学感染分子生物学分野 特別研修員

有吉 渉

要 旨

口腔内の感染症が原病巣となり、二次的に様々な全身感染症が誘発されることは古くから知られていたが、その発症メカニズムに関しては不明な点が多く残されていた。近年になって、歯周病の研究が細胞レベルあるいは分子レベルで解析されるようになり、歯周病原性細菌が誘発する全身疾患に関する研究も急速に進展した。さらに、高度の高齢化社会となった我が国においては、要介護高齢者の口腔管理により誤嚥性肺炎の発症が抑えられるという調査研究報告が発表され、にわかに口腔細菌と全身疾患に関する研究が注目されるようになった。

そこで、本稿では、口腔内感染症が誘因となって引き起こされる歯性病巣感染に加えて、歯周病原性細菌あるいは口腔内常在菌により引き起こされる全身疾患について最新の研究成果を紹介し、それを踏まえて口腔内細菌が全身疾患を引き起こすメカニズムについて概説する。

キーワード／口腔内常在菌、歯周病原性細菌、日和見感染症、歯周医学、サイトカイン

はじめに

これまでの口腔内感染症の研究はう蝕と歯周病を中心として展開されてきたが、その進展に口腔細菌学が大きく寄与してきたことは、これまでの国内外の研究成果の蓄積を見ても明らかである。そのうち、う蝕については、1960年から、米国、ヨーロッパ、日本で、う蝕原性レンサ球菌と総称されるう蝕原因菌の研究が急速に進み、今では、う蝕は予防可能な歯科疾患であるという考え方が定着している。一方の歯周病に関する細菌学的研究は、細菌の嫌気培養技術の進歩という時代的な背景のなかで急速に進展し、現在では、歯周病の発症と進行に関与する細菌を歯周病原性細菌と総称し、これらの細菌の病原性が細菌遺伝学的手法を用いて解析されてきた。

今日、口腔細菌学の研究は、う蝕と歯周病の病原菌を対象としたものだけでなく、健康増進という観点に立ち、口腔内常在菌に起因する全身疾患の発症メカニズムの解析が進められている。とくに、口腔内に存在するプラークに関する研究は、特徴的な細菌生態系を有するバイオフィームという視点で展開されている。一般に、バイオフィーム中の細菌は粘着性の多糖体のなかに生息しているということもあり、臨床的に難治性感染症となる事例が多い。バイオフィームが形成されている病巣では、抗生物質や生体の体液中の抗菌物質が病巣局所に浸透しにくい環境が作られ、さらに、免疫担当細胞の機能も制限され、感染症としては持続的かつ難治性になる。したがって、バイオフィーム感染症の治療および予防は、浮遊相のなかで病原性を発揮する病原細菌による感染症と異なる対応が求められる。

一方、近年の感染症の動向を見ると、新興・再興感染症などの致死性の高い疾患とともに、高齢者などの易感染性宿主における日和見感染症が大きな社会問題となっている。たとえば、口腔内に常在する細菌が、口腔内から気道あるいは血液を介して全身の各臓器に定着すると、思わぬところで感染症が引き起こされる。歯科治療における観血処置で一過性の菌血症が引き起こされ、心臓に基礎疾患を有する患者で亜急性心内膜炎が誘発されるということは古くから知られていた。このような異所性感染症は、平素無害菌であっても感染部位によっては重篤な疾患を誘発するという点では、日和見感染症としての一面も有している。

そこで、本稿では、口腔内細菌による病気について、全身疾患に起因する口腔内細菌という視点で概説し、口腔の病気と全身の健康という今回のテーマに即した話題を提供する。

歯性病巣感染について

細菌感染により引き起こされた慢性炎症性疾患が原発巣となり、病巣と直接関連のない遠隔の臓器や組織に、二次的に器質的変化や機能障害が惹起される病態を病巣感染 (focal infection) という。特に、口腔の疾患により引き起こされる病巣感染は歯性病巣感染と定義され、すでに19世紀初めにこの疾患の症例が報告されている。歯性病巣感染の原発巣としては慢性辺縁性歯周炎、根尖性歯周炎、顎骨骨髓炎などがあげられ、多くの場合、急性症状を認めない。二次疾患としては、心血管系疾患の他に、リウマチ性病変、貧血、腎炎、神経炎などの発症例が報告されている。

20世紀に入ってから、歯性病巣感染の成因について数多くの臨床的あるいは基礎的な研究成果が発表されてきた。当初、原発巣細菌が血流へ侵入し、病原菌やその産物が生体内の遠隔臓器や組織に定着し、二次疾患を生じるという細菌説 (菌血症説) が有力であるとされてきた。しかし、アレルギー説、シュワルツマン現象説、神経説、ストレス説なども提唱されており、原発巣から二次疾患に至る発症のメカニズムに関して統一見解は得られていない。近年になって、各種サイトカインの免疫および炎症における役割が分子レベルで明らかにされ、病巣感染の発症も、サイトカインや炎症性メディエーターにより誘発されるという考え方が定着してきている。

歯周病の直接の原因が、歯面に付着するプラークであり、歯周炎がプラーク中に生息する

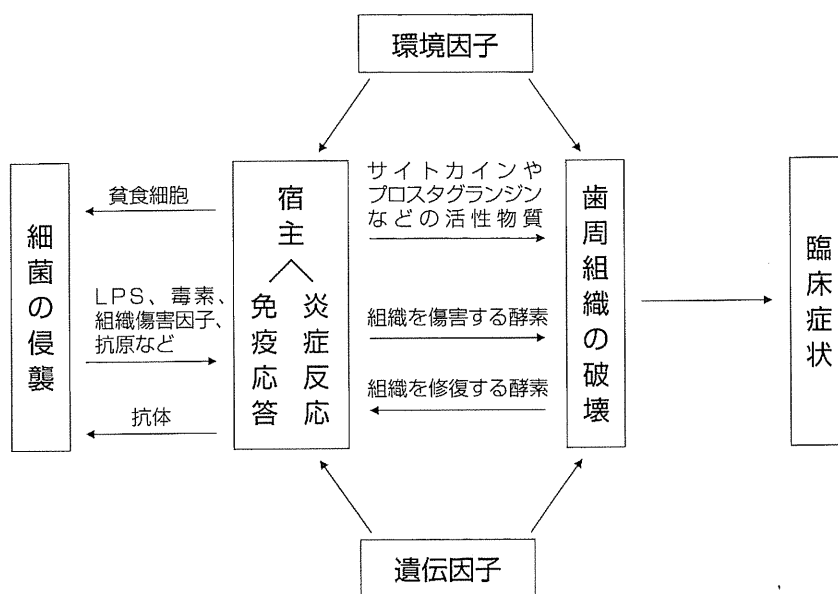


図1. 歯周病発症の新しいパラダイム¹⁾

グラム陰性嫌気性細菌によって引き起こされることは、現在では疑う余地のない事実である。近年、歯周病が進行していく過程で、数種のグラム陰性嫌気性細菌の存在が必須であるものの、宿主側の要因も深く関与していることがあらためて指摘されている。歯周病原性細菌の侵襲を受けた歯周組織では感染防御機構が働き、免疫応答や炎症反応というかたちで応答する。さらにこのような一連の応答が慢性化あるいは重篤化すると、局所に炎症性サイトカインやメディエーターが過剰に産生され、これらが要因となって歯周組織の破壊が引き起こされる。Pageらは、*Periodontology* 2000¹⁾のなかで、このような歯周病における一連の病態変化を新しいパラダイムというかたちで表現した(図1)。

さらに、歯周病原性細菌の刺激により、免疫担当細胞から分子シャペロンとして機能する熱ショックタンパク質(heat shock protein)が産生され、これに対する自己免疫応答が、動脈硬化の一因であるとする報告もある²⁾。その他、心血管系疾患の増悪因子で、歯周疾患との相関を示すサイトカインや炎症性メディエーターとして、Interleukin-1 (IL-1)、IL-4、IL-6、IL-18、プロスタグランジン、フィブリノーゲンなどが報告されている³⁻⁵⁾。

以上、これまで得られた知見を総括すると、歯周病原性細菌はいくつもの病原因子を介して、直接のおよび間接的に歯周炎や全身疾患の発症に関与しているという図式が浮かび上がってくる(図2)。

口腔細菌と全身疾患との関わり

近年になって、口腔細菌が誤嚥性肺炎、心内膜炎そして心血管系疾患といった全身疾患に

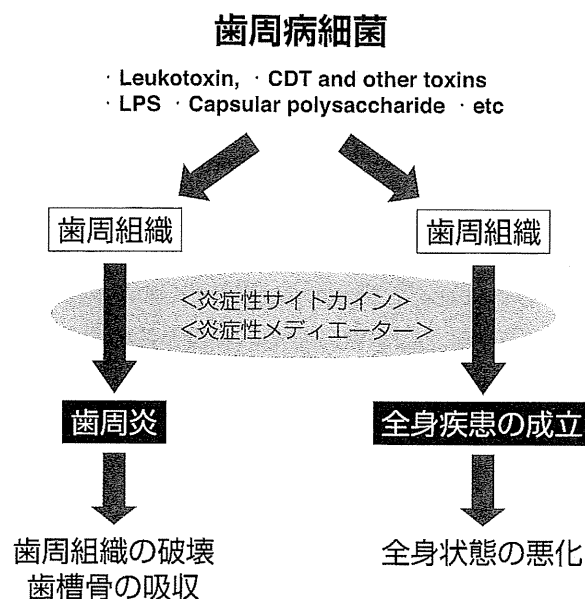


図2. 歯周病原性細菌による歯周炎および全身疾患の発症について

深く関与していることが報告されている⁶⁾。そこで、本稿では、現在、社会的に話題となっている全身疾患のなかで、誤嚥性肺炎、心内膜炎および心血管性疾患について概説する。

1. 誤嚥性肺炎との関わり

超高齢者社会を迎えている我が国において、高齢者などの易感染性宿主における感染は日和見感染症として発症することが多く、なかでも高齢者感染症における致死率からみると、肺炎は成人における3倍と非常に高い致死率を示している。そのようなこともあって、近年、高齢者の介護・看護の医療現場において誤嚥性肺炎が注目され、本疾患に関する臨床疫学的研究成果が数多く報告されている。

高齢者では、嚥下反射、咳反射などの不随意反射機能や気管や気管支に存在する線毛による異物除去機能が低下することに加えて、肺での感染防御に重要な役割を果たす肺泡マクロファージによる感染防御機能が減弱する。このような状況下で、口腔内細菌は、唾液、食物残渣や脱落した口腔粘膜上皮細胞とともに誤嚥によって気道に入り込み、その後、肺で定着して誤嚥性肺炎を引き起こす。事実、歯周病原性細菌として知られているグラム陰性桿菌 *Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia*、*Fusobacterium nucleatum*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* が誤嚥性肺炎患者から高頻度に検出される。さらに、口腔内常在細菌と誤嚥性肺炎の発症との間に因果関係があるという研究成果も数多く報告され、予防措置として口腔ケアが効果的ということに関しては一定の理解が得られている。しかし、口腔環境を口腔細菌学的に評価する方法は確立されていないということもあって、臨床現場から口腔内の細菌量を簡便に測定する機器の開発が望まれている。

2. 心内膜炎との関わり

以前から、歯科疾患により引き起こされる心疾患として、細菌性心内膜炎が報告されていた。この疾患は先天性心疾患や心臓弁膜症の患者で多く見られるという特徴を有している。一方で、人工弁で起こる乱流ジェットによって心内膜が傷つけられ、それを契機として心内膜炎が誘発されるということが報告されている。このような場合、まず、損傷部位に血小板とフィブリンが沈着して非細菌性血栓性疣腫 (nonbacterial thrombogenic vegetation : NBTV) が形成される。それに加え、血流中に流入した口腔内細菌が心臓まで運ばれて NBTV が形成された部位に定着すると、細菌性心内膜炎が悪化する。たとえば、抜歯などの口腔外科処置によって、細胞付着能力が非常に高い *Streptococcus sanguinis*、*P. gingivalis* などの口腔内細菌は NBTV 上に付着増殖して病巣を拡大する可能性は高い。現在では、これらの細菌側の付着因子に関わる基礎研究が盛んに行われ、心内膜炎の発症メカニズムが明らかとなってきている⁷⁾。もちろん、臨床的に細菌性心内膜炎の発症を防ぐには、歯科治療時に菌血症を誘発させないように処置が必要であるということを忘れてはならない。

3. 心血管系疾患との関わり

先進国では、悪性新生物に次いで、脳梗塞や心筋梗塞などの心血管系疾患が死因の上位を占めている。近年の大規模な疫学調査の結果から、アテローム性動脈硬化および心筋梗塞と歯周炎との相関が示され、歯周炎がこれらの疾患のリスクファクターとしてクローズアップされている⁸⁾ (図3)。一般に、歯周病原性細菌が心血管内皮細胞に作用し、様々な炎症反応が誘発され、その結果、動脈硬化や梗塞巣の形成が促進される。そのような状況を引き起こす因子の1つとして、*P. gingivalis* や *A. actinomycetemcomitans* などの歯周病原性細菌由来

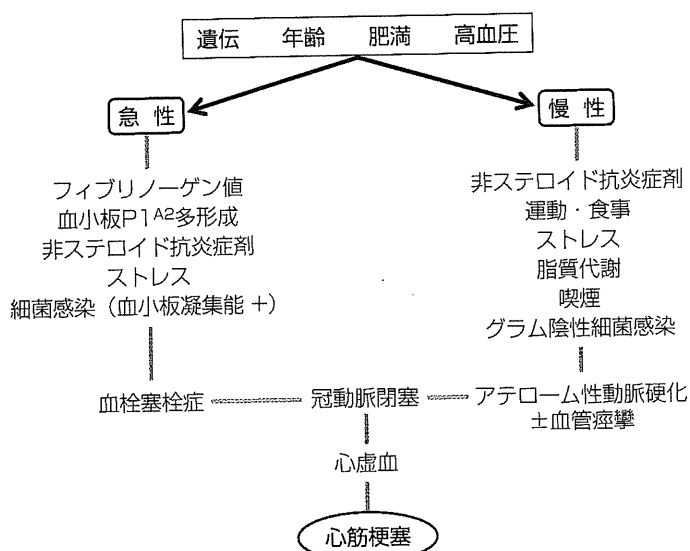


図3. 虚血性心疾患の発症に関わる危険因子

のリポ多糖が重要な役割を果たしている。我々は一連の研究で、リポ多糖がマクロファージを持続的に刺激して、アテローム性動脈硬化を助長するということが明らかにしている⁹⁾(図4)。

また、歯周病原性細菌の一種 *P. gingivalis* によって活性化されたマクロファージは血管内膜に侵入し、サイトカインや炎症性メディエーターの産生を誘導する。さらに、血管内皮にコレステロールが沈着し、相乗的に血管狭窄や血栓形成が進み動脈硬化が進行する。Iwamoto らは、動脈硬化に関与する因子である C 反応性タンパクや腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α) が歯周治療後低下することを報告しており、これらの炎症性メディエーターやサイトカインが動脈硬化の増悪因子としての歯周疾患のキーメディエーターとなる可能性を示唆している¹⁰⁾。さらに、マウスを用いた感染モデルで、TNF- α は IL-1 とその受容体の産生を高め、サイトカインネットワークの一端を担っていることが報告されている¹¹⁾。

おわりに

20 世紀後半、口腔細菌学の研究者は、精力的にう蝕と歯周病といった歯科特有の感染症の発症メカニズムを明らかにしてきたが、現在では、それぞれの疾患が予防可能であるという共通認識を持つに至った。一方で、歯周病に関しては、全身疾患との関わりに目が向けら

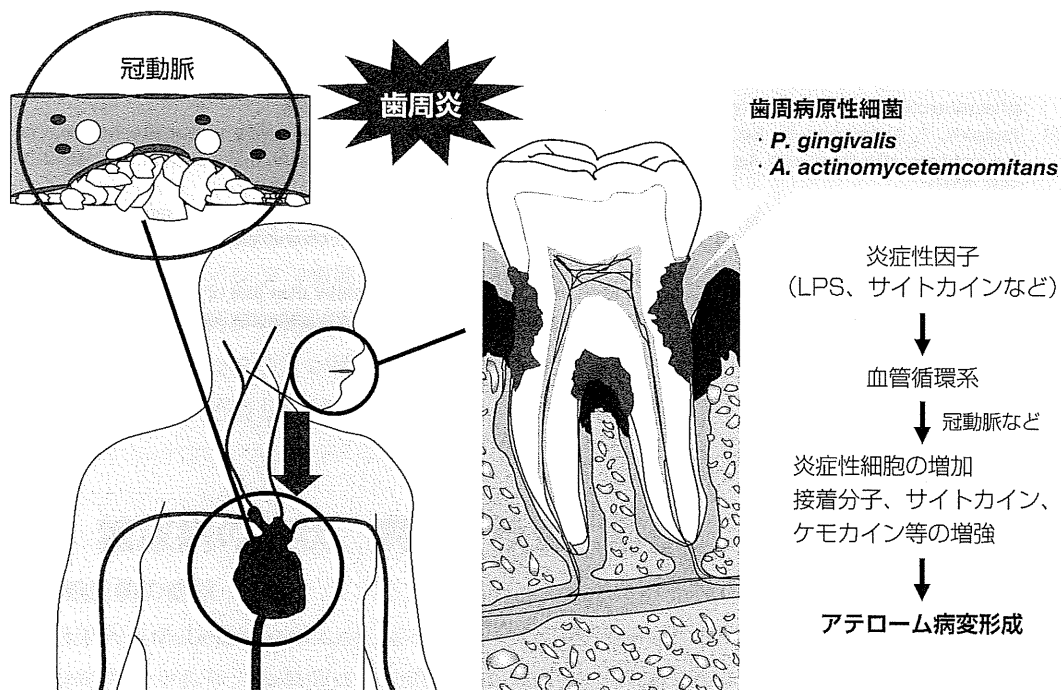


図4. 歯周病と動脈硬化との関係

れ、歯周医学という新たな学問領域のもとで、基礎および臨床的研究が急速に進展した。

現在、21世紀に入り、歯科医療の担い手である歯科医師、歯科衛生士、歯科技工士に対して、歯科医療の進むべき一つの方向性として、国民の健康増進を念頭に入れた歯科医療の展開が求められている。それにともない、それぞれの職種に就く次世代を教育する場である大学でも教育カリキュラムの見直しが行われている。その際、歯科医療を通じて国民の健康増進に寄与するためには、歯科医療人がお互いの立場を理解し、チーム医療を行うという意識の醸成が必要である。そのうえで、歯科医療人は歯科医療の枠組みに留まらず、他の医療人との連携が求められていることも忘れてはならない。さらに、次世代の歯科医療人に、口腔の健康が全身に健康増進につながるということを教育していくうえで、歯科医療人に口腔医学の知識の涵養が必要不可欠であるということに疑いを挟む余地はない。

参考文献

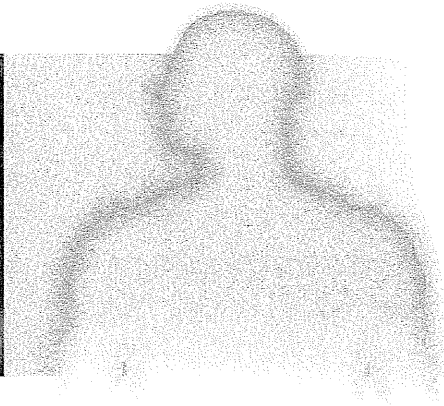
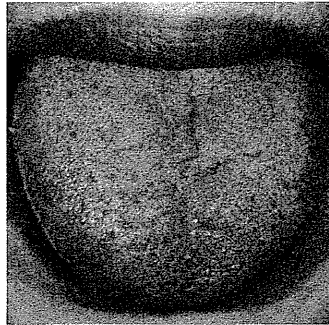
- 1) Page, R.C., Kornman, K.S.: The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000, 14:9-11, 1997.
- 2) Ford, P.J., Yamazaki, K., Seymour, G.J.: Cardiovascular and oral disease interactions: what is the evidence? *Prim Dent Care*, 14:59-66, 2007.
- 3) Janket, S.J., Jones, J.A., Meurman, J.H. et al.: Oral infection, hyperglycemia, and endothelial dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105:173-179, 2008.
- 4) Gani, D.K., Lakshmi, D., Krishnan, R. et al.: Evaluation of C-reactive protein and interleukin-6 in the peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, 13:69-74, 2009.
- 5) Buhlin, K., Hultin, M., Norderyd, O. et al.: Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J Clin Periodontol*, 36:541-549, 2009.
- 6) Friedwald, V.E., S. Kornman, K.S., Beck, J.D. et al.: The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editor's Consensus: Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 104:59-68, 2009.
- 7) Ge, X., Kitten, T., Chen, Z. et al.: Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. *Infect Immun*, 76:2551-2559, 2008.
- 8) Gaetti-Jardim, E. Jr., Marcelino, S.L., Feitosa, A.C. et al.: Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J Med Microbiol*, 58:1568-1575, 2009.
- 9) Tsutsumi, T., Nakashima, K., Isoda, T. et al.: Involvement of adhesion molecule in in vitro plaque-like formation of macrophages stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J Periodontol Res*, 45:550-556, 2010.
- 10) Iwamoto, Y., Nishimura, F., Soga, Y. et al.: Antimicrobial periodontal treatment decreases serum C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, but not adiponectin levels in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 74:1231-1236, 2003.
- 11) Graves, D.T., Chen, C.P., Douville, C. et al.: Interleukin-1 receptor signaling rather than that of tumor necrosis factor is critical in protecting the host from the severe consequences of a polymicrobe anaerobic infection. *Infect Immun*, 68:4746-4751, 2000.

歯科医師・歯科衛生士ができる

舌診の すすめ!

患者さんの全身状態を知るために

編著 | 柿木保明 九州歯科大学 教授



HYORON

舌苔形成の細菌学的背景

おき なが とし のり¹ にし はら たつ じ²
沖永 敏則¹ 西原 達次²

九州歯科大学 健康増進学講座 感染分子生物学分野 I 助教¹ 2 教授²
〒803-8580 福岡県北九州市小倉北区真鶴2-6-1

1 口腔の常在微生物

皮膚や粘膜部位における常在微生物叢には複数種の微生物が存在し、個々の微生物独自の特徴のほか、集団としての特性を発現している。特に口腔は、解剖学的に非常に複雑な環境となっていることから、他の部位の常在細菌叢と比べてより多彩な様相を呈している。

口腔内の常在微生物は、出産時に産道を通過するときに微生物に曝露されることによって口腔内に定着し、それを起点として微生物叢の形成が始まる。その中でも唾液微生物叢で主要なレンサ球菌である *Streptococcus salivarius* は、生後1日以内にすでに80%程度の新生児の口腔から検出されるといわれている。その後、成長に伴い、母親をはじめとする周囲の人々、あるいは食物や飲み物を介して多種多様の微生物が口腔内に定着・増殖する。さらに、歯の萌出など加齢とともに口腔常在微生物叢は大きく変化していくことが知られている。

2 健康成人における舌の微生物叢

前述のように口腔常在微生物叢は多彩で、その部位によって構成が異なる。健康成人における舌の微生物叢は、唾液の微生物叢に比較的類似しており、レンサ球菌属をはじめとする通性嫌気性菌^{*1}がきわめて優位で、偏性嫌気性菌^{*1}は35%程度に過ぎない¹⁾(表1)。その中でも、*S. salivarius* がその半数を占め、*Streptococcus sanguinis* と *Streptococcus mitior* がこれに続いて検出される。う蝕の原因菌として有名な *Streptococcus mutans* などは、1%以下の検出率に過ぎない。ブドウ球菌属、ナイセリア属、バイヨネラ属の検出率は、それぞれ6.5%、3.4%、1.6%で、唾液、プラーク、歯肉溝などに存

*1：有酸素状態では呼吸によって、無酸素状態では発酵によって、それぞれエネルギー産生を行う菌群を総称して通性嫌気性菌といい、有酸素状態のほうが発育が良好である。これに対して、発酵のみでエネルギー産生を行う菌群を総称して偏性嫌気性菌といい、活性酸素の無毒化機構を欠いているため、有酸素状態では死滅する。

表1 健康成人における舌の常在微生物叢¹⁾

細菌種	検出頻度 (%)	細菌種	検出頻度 (%)
通性嫌気性グラム陽性球菌	44.8	通性嫌気性グラム陰性桿菌	3.2
レンサ球菌属	38.3	偏性嫌気性グラム陽性球菌	4.2
<i>S. mutans</i>	(0~1)*	偏性嫌気性グラム陰性球菌	16.0
<i>S. sanguinis</i>	(10~20)*	偏性嫌気性グラム陽性桿菌	8.2
<i>S. mitior</i> (<i>S. mitis</i>)	(10~30)*	偏性嫌気性グラム陰性桿菌	8.2
<i>S. salivarius</i>	(40~60)*	フゾバクテリウム属	0.7
<i>S. milleri</i>	(0~1)*	黒色集落形成性菌	0.2
ブドウ球菌属	6.5	黒色集落非形成性プレボテラ属	5.1
通性嫌気性グラム陰性球菌	3.4	カンピロバクター属	2.2
通性嫌気性グラム陽性桿菌	13.0	口腔スピロヘータ	<1.0

* : () 内は全レンサ球菌属に対する検出頻度。

在する微生物叢に比べると検出頻度が高い。フゾバクテリウム属やカンピロバクター属の検出頻度は比較的lowく、成人性歯周炎に深く関係する黒色集落形成性グラム陰性桿菌群も1%以下しか検出されない。

ただし、これらの微生物叢は、宿主側の要因（唾液の性質や分泌量、口腔清掃状態、食習慣、歯や歯周組織の病的変化、全身疾患や薬剤の投与）や微生物側の要因（嫌気度、酸性度、栄養源の供給状態、拮抗作用や共生作用の有無など）によって、同一個体においても口腔および全身状態の変化などに伴って常に変化し、一定ではない。また、個人差も大きい。必ずしも表1のような典型的な構成比率を示すとは限らない。特に、口腔内のプラークの性状、う蝕や歯周病の罹患状況は、舌の微生物叢に大きな影響を及ぼすことを考慮する必要がある。

舌苔の状態と構成微生物叢の変化

舌苔の微生物叢に関する研究は、いわゆる西洋医学の中ではさほど見当たらない。しかし東洋医学の領域では、舌苔の状態の違いに基づく微生物叢の変化が報告されている²⁾。この中では、舌苔形成を認

めた66例の症例から検体を分離し、菌種を同定している（表2・表3）。この報告に基づき、舌苔の微生物叢と色調の関係をまとめると次のようになる。

薄白苔は生理的な範囲内の舌苔で、ほぼ単一の菌が増殖しており、 α 溶血性^{*2}を示す緑色レンサ球菌 (*S. sanguinis* や *S. mitior* など)、またはナイセリア属とその近縁菌が検出されている。しかし、この中に、唾液中に存在するレンサ球菌である *S. salivarius* の増減に関してはまったく記載がない。

薄白膩苔^{はくじない}は、薄白苔から糸状乳頭の数と分岐、および苔の粘着性が増加したもので、生体の抵抗力がやや落ちたときに観察されることが多い。薄白苔よりも構成菌種が増加し、四連球菌（ミクロコッカス属）、表皮由来球菌 (*Staphylococcus aureus* や *Staphylococcus epidermidis* など)、真菌も検出されるようになる。

厚白膩苔^{はくじない}は、薄白膩苔の舌苔の蓄積が増したもので、薄白膩苔よりも表皮由来球菌の検出頻度が高い

*2 : レンサ球菌を血液寒天培地上で培養したとき、コロニー周囲に明瞭な溶血環を形成するものを β 溶血性レンサ球菌といい、溶血環が不明瞭で緑色を呈するものを α 溶血性レンサ球菌という。コロニー周囲にまったく溶血環が生じないものは、 γ 溶血性（非溶血性）レンサ球菌という。

表2 各種の舌苔における菌種の分布状況²⁾

舌苔の種類	症例数	緑色レンサ球菌	ナイセリア属と近縁種	四連球菌	グラム陰性桿菌	表皮由来球菌	真菌
薄白苔	9	7	4	ND	ND	ND	ND
薄白膩苔	6	6	5	2	ND	1	1
厚白膩苔	8	6	4	3	ND	3	1
薄黄膩苔	7	6	3	3	ND	ND	ND
厚黄膩苔	27	19	13	3	5	4	6
黒苔	4	2	1	2	1	ND	ND
光剥苔	5	3	2	ND	1	1	2

注：数字は菌が検出された症例数，ND：未検出。

傾向を示している。厚白膩苔および薄白膩苔の色調は、ナイセリア属から独立した近縁菌で、シュードモナス属とも共通点の多い *Moraxella catarrhalis* の影響が大きい。この細菌は淡緑色色素を産生し、灰白色のコロニーを形成する。これに表皮由来球菌の白色および黄色のコロニーが混在することで、独特の白色系統の色を呈するものと考えられている。

薄黄膩苔^{おうしな}および厚黄膩苔は、感染性の発熱性疾患の際にしばしば観察される粘着性の黄色の舌苔で、薄白膩苔および厚白膩苔からの移行が多いとされている。緑色レンサ球菌、ナイセリア属とその近縁菌、四連球菌、および表皮由来球菌が優位である。この舌苔の色調は、*M. catarrhalis* の灰白色のコロニーに、四連球菌および表皮由来球菌の産生する黄色およびオレンジ色のコロニーが多量に混合することによるものと考えられている。

黒苔は、前述の白苔や黄苔を呈する病態が悪化した際にしばしば認められ、舌苔が黒色を示すようになったものである。糸状乳頭が異常に伸張し、この間隙に堆積した微生物や壊死した上皮細胞が硫化水素 (H₂S) を生じ、ヘモグロビンなどと結合して硫化鉄 (Fe₂S₃) となった結果、黒色を呈するといわれている³⁾。従来は *Candida albicans* の増殖によって生ずると考えられていたが、この報告では真菌類

表3 各種の舌苔における検出菌種²⁾

舌苔の種類	例数	単一菌種 検出頻度 (%)	例数	複数菌種 検出頻度 (%)
薄白苔	7	77.8	2	22.2
白膩苔	2	14.3	12	85.7
黄膩苔	7	20.6	27	79.4*
黒苔	2	50.0	2	50.0**
光剥苔	1	20.0	4	80.0**

* : p < 0.05, ** : p < 0.01 (vs 薄白苔)

は検出されず、口腔常在菌であるグラム陽性菌が多く検出されている。この報告とは別に、*Bacillus subtilis* が優位であり、これによって黒色色素が産生される結果として舌が黒色を呈するという報告もあり⁴⁾、黒色色素の由来についてはいまだ定説が得られていない。

光剥苔^{こうはくたい}は、糸状乳頭が限局的に消失して舌苔そのものが完全に剥落したもので、いわゆる鏡面舌の状態となったものである。胃疾患や肝疾患、その他の慢性疾患を有する場合に起こりやすいといわれている。微生物叢としては、緑色レンサ球菌、ナイセリア属とその近縁菌、真菌などが優位で、四連球菌や表皮由来球菌が少ないことが特徴である。

表4 舌苔の形成が認められた患者の唾液 pH²⁾

舌苔の種類	症例数	口腔内 pH (平均±SD)
薄白苔	133	7.272±0.262
白厚苔	29	6.614±0.332*
薄黄苔	23	7.157±0.278
黄厚苔	40	6.650±0.386*
薄膩苔	15	7.170±0.442
光紅苔	22	6.623±0.342*

* : p < 0.01 (vs 薄白苔)

表5 唾液分泌量に影響を及ぼす疾患と薬剤

疾患	糖尿病, サルコイドーシス, Sjögren 症候群, パーキンソン病, ウイルス感染, 頭頸部の放射線治療, 唾液腺摘出術, 唾液腺の先天的欠如, 精神的ストレス, など.
薬剤	催眠鎮痛薬, 抗炎症薬, 抗不安薬, 抗うつ薬, 抗てんかん薬, 鎮痙薬, 抗パーキンソン薬, 骨粗鬆症治療薬, 抗不整脈薬, 降圧薬, 抗コリン薬, 抗ヒスタミン薬, 鎮咳薬, 利尿薬, 気管支拡張薬, 消化器潰瘍治療薬, など.

微生物叢に影響を及ぼす宿主要因と舌苔形成との関連

このような種々の舌苔形成には、宿主要因も大きく関与していると考えられている。たとえば、口腔内 pH も舌苔の微生物叢の構成変化に影響を及ぼす。

各種の舌苔形成が認められた患者の唾液 pH を比較検討したところ、白厚苔、黄厚苔、および光紅苔が形成されている患者では、生理的な範囲内の舌苔である薄白苔の場合よりも有意に pH が低下し、口腔内が弱酸性の環境に傾いているという結果が報告されている²⁾ (表 4)。さらに、酸性環境では角化上皮細胞の正常な脱落が阻害された結果、角質層が厚くなり、糸状乳頭が異常に伸張して、ここに食物残渣、壊死した上皮細胞、および微生物が堆積して病的な舌苔形成に至ったとした上で、そこでの微生物の代謝によって口腔内環境が弱酸性に維持されているのではないかと記載されている。

また、前述の舌苔の微生物叢に関する報告では、口腔内が酸性環境にある白厚苔や黄厚苔などでは、他の舌苔形成症例では認められない真菌の検出が認められている (表 2)。口腔内真菌として代表的な *C. albicans* は、健康成人の舌の微生物叢で優位な

口腔内常在細菌と異なり、中性よりも弱酸性のほうが増殖が盛んであるといわれている⁴⁾。弱酸性環境を舌表面に作り出す白厚苔や黄厚苔などで真菌類の検出率が高かったのは、このことに起因している可能性が高い。

その他、唾液分泌量が低下する各種の疾患や薬剤 (表 5) の服用時には、多くのケースで舌苔形成が認められることが知られている。白血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値などは舌苔の厚さと正の相関を示すが、アミラーゼ値は逆に負の相関を示すことが報告されている⁵⁾。一方、喫煙の習慣も舌苔形成に促進的に作用することが明らかになっている⁶⁾。

歯周病が舌苔の微生物叢に及ぼす影響について

これまで総論的に舌苔と口腔内微生物叢との関係を述べてきたが、ここでは成人に多く見られる歯周病との関連について考察する。

現在、歯周病細菌として *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* などがクローズアップされている。高橋

らは、歯周組織の健全な若年成人および高齢者の舌苔からは歯周病細菌がほとんど検出されないという論文を発表している⁷⁾。一方で、舌苔の発生部位である舌背が歯周病細菌の受け皿になり得るという報告⁸⁾も見られ、その因果関係については不明な点が多く残されている。

また、唾液分泌減少による口腔乾燥症や、口腔ケアの不十分な高齢者においては、口腔内の自浄作用の低下とともに口腔内環境が悪化する。あわせて、このような口腔では口臭が大きな問題となる。舌苔中の細菌はケラチンを分解して口臭の原因となる揮発性硫黄化合物を発生することが知られている。さらに高齢者が歯周病に罹患すると、歯周ポケット内の細菌が豊富な滲出液中のタンパク質を栄養源として消費し、その過程で産生されるメチルメルカプタン (CH₄S) が口臭の原因となると考えられている⁹⁾。事実、Morita ら^{10, 11)}により、歯周病患者における口臭と歯周病の関連性が疫学的に証明されている。

おわりに

このように、舌苔の微生物叢は患者の病態や口腔内状態によって、その構成がかなり異なることが明らかになりつつある。要介護高齢者では、口腔乾燥

の症状とともに口腔内清掃が十分になされず、自浄作用の低下に伴い舌苔が生じる。舌苔形成が誤嚥性肺炎や強い口臭の原因になっているという指摘もあり、高齢化社会となった現在、この分野での研究の進展が望まれる。

参考文献

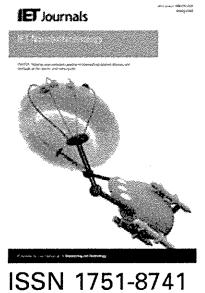
- 1) Hamada S, Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev, 44 (2): 331-384, 1980.
- 2) 陳 澤霖, 吳 溶州, 薰 發慶, 胡 慶福, 陳 依萍, 傅 秀美: 口腔局部環境改變与病理舌苔形成的關係. 天津中医雜誌, 1985 (1): 24-26, 1985.
- 3) 原 敬二郎監修: 舌診カラーガイド. 54-55, ミクス, 東京, 1996.
- 4) 金子明寛: 口腔カンジダ症の治療法. デンタルダイヤモンド, 24 (335): 37-43, 1999.
- 5) 柿木保明, 西原達次: 舌苔と全身状態. 日本歯科評論, 694: 17-19, 2000.
- 6) 長坂和彦, 土佐寛順ほか: 漢方医学的脈候, 舌候, 腹候の関連性に関する検討. 日本東洋医学雑誌, 49 (1): 35-50, 1998.
- 7) 高橋雅洋, 岸 光男: 舌苔中の歯科疾患関連細菌と口腔内状況との関連性. 口腔衛生学会雑誌, 56 (2): 137-147, 2006.
- 8) Roldán S, Herrera D, Sanz M: Biofilms and the tongue: therapeutical approaches for the control of halitosis. Clin Oral Investig, Dec; 7 (4): 189-197, 2003.
- 9) 柿木保明, 山田静子編著: 看護で役立つ口腔乾燥と口腔ケア—機能低下の予防をめざして. 22-24, 医歯薬出版, 東京, 2005.
- 10) Morita M, Wang HL: Relationship between sulcular sulfide level and oral malodor in subjects with periodontal disease. J periodontol, 72 (1): 79-84, 2001.
- 11) Morita M, Wang HL: Relationship of sulcular sulfide level to severity of periodontal disease and BANA test. J periodontol, 72 (1): 74-78, 2001.

*

*

*

Published in IET Nanobiotechnology
 Received on 31st May 2010
 Revised on 6th October 2010
 doi: 10.1049/iet-nbt.2010.0011



Development of rapid oral bacteria detection apparatus based on dielectrophoretic impedance measurement method

R. Hamada^{1,2} J. Suehiro² M. Nakano² T. Kikutani³ K. Konishi⁴

¹R & D Center, Panasonic Healthcare Co., Ltd., 2131-1, Minamikata, Toon, Ehime 791-0395, Japan

²Department of Electrical and Electronic Engineering, Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University, 744, Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

³Division of Clinical Oral Rehabilitation, Graduate School of Life Dentistry, The Nippon Dental University School of Life Dentistry, 3-16, Fujimi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8158, Japan

⁴Department of Microbiology, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo, 9-20, Fujimi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

E-mail: hamada.ryo@jp.panasonic.com

Abstract: In this study, a bacteria detection apparatus based on dielectrophoretic impedance measurement (DEPIM) method was demonstrated for rapid evaluation of oral hygiene. The authors integrated a micro electrode chip on which bacteria were captured by dielectrophoresis (DEP), an AC voltage source to induce DEP force, and an impedance measurement circuit to a portable instrument that enables rapid and automated oral bacterial inspection in hospitals and clinics. Special considerations have been made on effects of high electrical conductivity of oral samples on DEP force and DEPIM results. It was shown experimentally and theoretically that using a higher electric field frequency for the DEP bacteria trap and the impedance measurement could realise DEPIM application to bacteria inspection from oral samples with higher conductivity. Based on these investigations, the authors optimised the frequency condition of the DEPIM suitable for inspecting an oral sample along with the design and development of a portable DEPIM apparatus for on-site inspection of oral bacteria. Under the optimised frequency condition, DEPIM results were in good agreement with the conventional culture method showing significant applicability of the DEPIM apparatus for practical rapid oral bacteria inspection.

1 Introduction

Detection of pathogenic microorganisms is a crucial process in medical diagnosis for confirming the existence of a particular disease. Microbiological infectious disease of the oral cavity is an important matter to be concerned since the relationship between periodontal disease, caries, pneumonia, influenza and oral bacteria has been established [1–3]. Recently, aspiration pneumonia has become a focus of attention with regard to patients staying at intensive care units [4] and elderly people in nursing homes [5] because of their high mortality rate, longer length of stay in hospital and increased medical cost [6]. Yoneyama *et al.* [7] investigated the onset of pneumonia and its mortality rate among older patients in a nursing home, obtaining values of 19 and 16%, respectively, within the investigation period. Aspiration pneumonia is thought to be because of the mis-swallowing of bacteria that inhabit the oral cavity and these bacteria reaching the lower respiratory tract [8]. In addition, El-Solh *et al.* [9] suggested that dental plaque may serve as a reservoir for respiratory pathogens. Inglis *et al.* reported that the development of pneumonia depends on the amount of bacteria aspirated into the lungs from saliva being the

medium that carries oral bacteria from dental plaque [10]. Influenza is a respiratory infection disease caused by the influenza viruses and has a high mortality rate in the elderly, and prevention of pandemic of influenza is a serious matter especially after a global outbreak of a new strain of H1N1 virus in 2009. Poor oral hygiene may result in increased susceptibility to influenza because bacteria enzymes may injure the oral mucosa and possibly accelerate the onset of viral infections [11]. Abe *et al.* suggest that it is necessary to accurately evaluate the amount of oral bacteria as a level of oral hygiene in order to prevent aspiration pneumonia [12] and influenza [3].

Conventionally, cultivation and colony counting techniques have been performed to evaluate oral hygiene [13] because cultivation is the most established method for inspecting the amount of bacteria not only for samples from the oral cavity but also for various samples from biogenics including humans, food, the environment etc. However, the cultivation method cannot provide a fast evaluation result since it requires rather a long time for bacteria incubation until the appearance of a visible colony on the culture medium (typically a few days); furthermore, it needs to be implemented by a specialist. Therefore in spite of this need,

evaluation of oral hygiene through the amount of oral bacteria has not been commonly used in clinical application except for research purposes. To solve these problems, several alternative bacteria counting methods have been developed. Adenosine TriPhosphate (ATP) bioluminescence is a rapid assay that detects luminescence caused by the enzyme reaction of ATP contained in various bacteria [14]. ATP bioluminescence is useful for on-site monitoring of bacterial contamination because the method does not require a culturing step, and compact equipment has been developed. However, it requires a reagent, which must be stored in a low temperature environment (typically 2 to 8°C) and must be used at room temperature. The direct-count technique using epifluorescence microscopy (EFM) is a highly sensitive bacteria detection method that requires a process of staining bacteria with fluorescent material and observation under a fluorescence microscope [15]. The measurement procedures are tedious, and inspectors need to have special skills in membrane filtration and microscopy.

Suehiro *et al.* proposed a biological cell detection technique called dielectrophoretic impedance measurement (DEPIM) based on dielectrophoresis (DEP) [16]. The DEPIM can also realise highly sensitive detection combined with electroporation [17, 18], and selective detection of biological cells according to their viability [19] or species by combining with an antigen–antibody reaction [20]. DEP is the electrokinetic motion of dielectrically polarised particles in non-uniform electric fields and is currently an active area of research in several laboratories [21, 22]. As most biological cells and macro molecules behave as dielectric particles in external AC electric fields, DEP has found many useful biotechnological applications. The DEPIM utilises positive DEP, which attracts polarised particles to a high field region, in order to capture biological cells onto an interdigitated electrode chip in the form of pearl chains. Higher cell population results in faster formation of the pearl chains, which bridge over the electrode gap and hence increase the admittance between the electrodes. By monitoring the temporal variation of the electrode impedance or admittance, the cell population can be quantitatively evaluated. By utilising positive DEP, it is possible to enrich the cell population on the microelectrode beyond that in bulk, realising highly sensitive detection of bacteria suspended in the aqueous medium. In addition, DEPIM can realise fast and simple bacteria inspection using only electrical phenomena and instruments without any preliminary chemical treatment.

The aim of this study was to adapt the DEPIM method to the detection of bacteria sampled from the oral cavity and to provide a new rapid, simple operation and on-site inspection method for the evaluation of oral hygiene through the amount of bacteria inhabiting the oral cavity. The bacterial inspection apparatus that utilises the DEPIM method should be applicable to a sample solution with high electrical conductivity. For example, a sample obtained from the oral cavity may include saliva that contains a large amount of electrolytic ions. In general, the positive DEP force becomes weak in a suspension medium with higher electrical conductivity. In order to realise DEPIM-based oral bacteria inspection, special attention was paid to the influence of suspension conductivity as well as electric field frequency on the DEP bacteria trapping process. Based on the experimental results, the DEP condition was optimised for oral bacteria detection and a hand held DEPIM apparatus was newly designed and developed, aiming at the practical application of DEPIM for the rapid and automated

inspection of oral bacteria in hospitals or clinics. In addition, bacteria samples obtained from the oral cavity were inspected to validate the effectiveness of the optimised DEPIM condition and the newly developed DEPIM apparatus.

2 Material and methods

2.1 Electrode

Two different electrode configurations were used. A smooth interdigitated electrode system was employed in all the DEPIM experiments because this type of electrode configuration is suitable for accurate impedance measurement [16]. The smooth interdigitated electrode arrays of gold were patterned on a polycarbonate substrate by a laser ablation technique. Each microelectrode strip had a 5 µm gap in which cells were trapped and formed into pearl chains by positive DEP. On the other hand, a castellated electrode configuration [23] was employed for the visual observation of the cell collection process using positive DEP. The castellated electrode arrays of chrome were patterned on a glass substrate by the photolithography technique, and the microelectrode was surrounded by a silicon rubber spacer to form a chamber in which 22 µl of cell suspension liquid was stored.

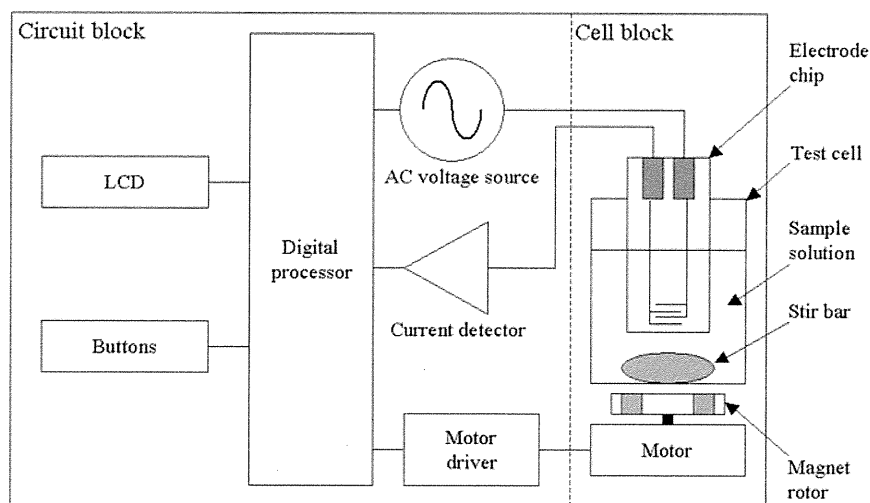
2.2 DEP observation equipment

The details of the DEP observation apparatus have been described before [16]. The cell suspension liquid was stored in a reservoir tank and circularly fed to the test chamber using a peristaltic pump. Sinusoidal AC voltage was generated by a function generator (WF 1945, NF Corporation, Japan) and applied to the electrode system. Visual observation of DEP was conducted using an inverted microscope (BX-51, OLYMPUS, Japan) and a CCD digital camera (C-5060Z, OLYMPUS, Japan). The flow rate of the cell suspension liquid fed by the peristaltic pump was 2.1 ml/min, and the amplitude of the applied voltage was 10.0 V peak–peak, respectively, which were found to be appropriate conditions for the observation of positive DEP in the preliminary tests.

2.3 DEPIM equipment

Fig. 1 shows a block diagram and a photograph of the newly designed and developed DEPIM apparatus. To enable rapid and automated bacterial inspection in hospitals and clinics, the apparatus was designed as a portable instrument to enable stand-alone measurement without any other instrument or cable. The apparatus consists of two main blocks, one is the ‘circuit block’ which has a measurement instrument function, and the other is the ‘cell block’ that includes the electrode and test cell.

All the necessary functions for the electrical measurement of DEPIM are installed in the circuit block. The AC voltage source generates AC voltage, which energises the interdigitated electrode to generate positive DEP force. AC current flowing through the electrode is measured by the current detector. The current is converted from analogue to digital, and is then transferred to a digital processor. The processor calculates the electrode capacitance from the amplitudes of the applied AC voltage and detected current, and the phase difference between the two components. The sequential measurement is carried out for 20 s, and temporal variation of the electrode capacitance is stored,



a



b

Fig. 1 Portable DEPIM apparatus

a Block diagram

b Photograph

then a tangent slope of capacitance change is calculated in order to estimate bacteria concentration, which has a linear relationship with the slope. According to DEPIM theory, bacteria concentration can be estimated by the increase rate of the capacitance as well as by the increase rate of the conductance [16]. In this study, the capacitance was preferred because the conductance change was expected because of the high ion concentration of oral samples and using the conductance change might have resulted in decreased accuracy regarding DEPIM. The processor also controls an LCD for the indication of the measurement results, some operation buttons, as well as a motor driver for driving a motor in the cell block to stir the sample solution.

In the cell block, 5 ml of bacterial suspension is stored in a test cell, in which the smooth interdigitated electrode is immersed. The electrode chip is connected to the AC voltage source and current detector in the circuit block. A magnetic stirrer continuously generates a circular flow in the test cell to enhance the DEP trapping of bacteria [16]. Impedance values measured by the DEPIM apparatus were

calibrated using a dummy load (a parallel connection of resistance and capacitance with known values), as well as a buffer with known conductivity.

2.4 Bacteria samples

2.4.1 Optimisation of DEP condition: El-Solh *et al.* reported that *Escherichia coli* (*E. coli*) was often found in the oral cavities of elderly people and could cause pneumonia [9]. Accordingly, for observation of the DEP trapping process and preliminary optimisation of DEPIM measurement conditions, *E. coli* strain K-12 (NBRC3301), which has a high growth rate and has been successfully employed in previous work [16–20], was employed as a representative of oral bacteria in order to improve the efficiency of the experiments. *E. coli* were incubated at 30°C on agar plates for 24 h. Before each measurement, cells were harvested from the agar and suspended in a 0.1 M mannitol solution. After several washings by centrifugation, they were finally resuspended in a 0.1 M mannitol solution

(conductivity $1 \mu\text{S cm}^{-1}$) at various diluted concentrations as determined by a colony counting method.

The oral cavity harbours a complex microbiota, with over 300 named species of bacteria so far isolated [6]. Abe *et al.* reported that bacteria exist in human saliva at a concentration ranging from 2.7×10^7 (pneumonia low-risk group) to $4.7 \times 10^8 \text{ cm}^{-3}$ (pneumonia high-risk group) [24]. Given that DEPIM can detect bacteria at a minimum concentration of 10^5 cm^{-3} [16], which is almost 1% of the lowest bacteria concentration expected in human saliva, the saliva can be diluted 100 times with deionised water so that the electrical conductivity is lowered to be as low as possible. According to Neyraud *et al.*, the conductivity of human saliva (mean \pm SD among seven healthy subjects) were $4115 \pm 1181 \mu\text{S cm}^{-1}$, and the maximum value was $7474 \mu\text{S cm}^{-1}$ [25]. This means that the maximum conductivity of the DEPIM sample after dilution 100 times becomes about $100 \mu\text{S cm}^{-1}$. Considering these conditions, the DEPIM experiments were conducted in the conductivity range from $5\text{--}150 \mu\text{S cm}^{-1}$. The conductivity of each sample solution was adjusted by dissolving sodium chloride in 0.1 M mannitol solution and checked by a conductivity meter (B-173, HORIBA, Japan).

2.4.2 Verification of testing oral samples: In order to ensure applicability of DEPIM to oral bacteria detection, samples were taken from 49 elderly residents in a care facility for elderly people requiring long-term care (This study was approved by the Ethics Committee of The Nippon Dental University, School of Life Dentistry in Tokyo.). Samples were collected from the median area of the tongue in contact with the mandibular first molar using a sterilised swab (1A754S, JCB, Japan). To avoid errors caused by an inadequate sampling process, the swab was pressed against the tongue with a constant force of 0.2 N by using a special device. The swab swiped the tongue surface twice (1 cm long for each swipe). The obtained samples were suspended in 7 ml of 0.1 M mannitol, and 5 ml was used as a sample for testing with DEPIM equipment, whereas the remaining solution was employed as a sample for the conventional culture method. For the culture method, samples were appropriately diluted in 0.1 M mannitol, spread over blood agar plates (each sample, 1–2 plates) using a spiral plating apparatus (Autoplate 4000; Spiral Biotech), followed by anaerobic culture at 37°C for 48 h. These operations were executed within several hours to prevent loss of viability of the bacteria. All visible colonies grown on the plate were counted using a colony counter (Acolyte; Synbiosys), and bacterial concentrations in the samples were determined. Correlations in the data obtained by these methods were then evaluated.

3 Results

3.1 Observation of DEP trapping process of bacteria

Photographs of the DEP collection of *E. coli* are shown in Fig. 2. The DEP collection observations were made at two different electric field frequencies of 100 and 800 kHz, and two different conductivities of the suspending medium of 1 and $50 \mu\text{S cm}^{-1}$. In the case of $1 \mu\text{S cm}^{-1}$, bacteria were trapped around the electrode corner because of positive DEP (Figs. 2a and b) at frequencies of 100–800 kHz. On the other hand, in the case of higher conductivity of $50 \mu\text{S cm}^{-1}$, bacteria were not trapped at 100 kHz. When forced flow was stopped, cells were focused at a weak

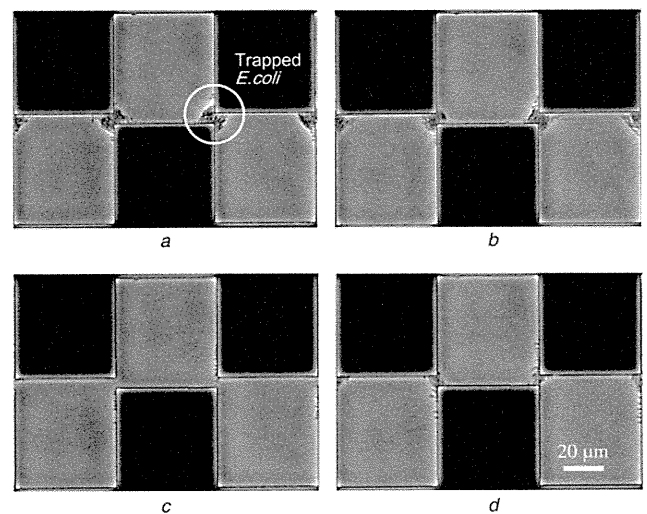


Fig. 2 DEP collection process of *E. coli*

AC signal of amplitude 10 V peak–peak was applied to a crenellated electrode for 15 s

- a At 100 kHz, $1 \mu\text{S cm}^{-1}$: bacteria were trapped by positive DEP around the electrode corner where the electric field strength becomes higher
- b At 800 kHz, $1 \mu\text{S cm}^{-1}$: the captured bacterial quantity was almost equal to a
- c At 100 kHz, $50 \mu\text{S cm}^{-1}$: hardly any bacteria were captured
- d At 800 kHz, $50 \mu\text{S cm}^{-1}$: the captured bacteria were slightly fewer than a and b

electric field region at the centre of the electrode gap surrounded by the electrode edge, showing that negative DEP became dominant under this condition (not shown in the picture). Some bacteria were captured at 800 kHz, although the number of trapped cells was slightly decreased compared to the case of the $1 \mu\text{S cm}^{-1}$ conductivity (Figs. 2c and d). These observation results suggest that positive DEP force exerted on the bacteria becomes weak with increased conductivity at the 100 kHz frequency.

3.2 DEPIM measurement using *E. coli* samples

DEPIM experiments were conducted in this range of conditions for $1\text{--}135 \mu\text{S cm}^{-1}$. Fig. 3 shows temporal variation of the electrode capacitance increment measured with *E. coli* at $5 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ (at 100 kHz) and $2 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$ (at 800 kHz). As explained in the previous work [16], the capacitance increase is because of the presence of bacteria that are trapped and enriched in the electrode gap. It was found that the capacitance increase rate at $t = 0$ was directly proportional to the cell population that was quantitatively evaluated by the DEPIM method.

At a frequency of 100 kHz, the capacitance increase rate in the case of $25 \mu\text{S cm}^{-1}$ was obviously lowered in comparison with $1 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Fig. 3a). However, at a higher frequency of 800 kHz, the temporal change of capacitance was almost the same for both the conductivities of 1 and $50 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Fig. 3b).

4 Discussion

The DEP force acting on a spherical particle of radius r suspended in a medium of permittivity ϵ_s is given by [26]

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi r^3 \epsilon_s \text{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

where E is the magnitude root mean square of the applied field and $\text{Re}[K(\omega)]$ is the real component of the Clausius–Mossotti

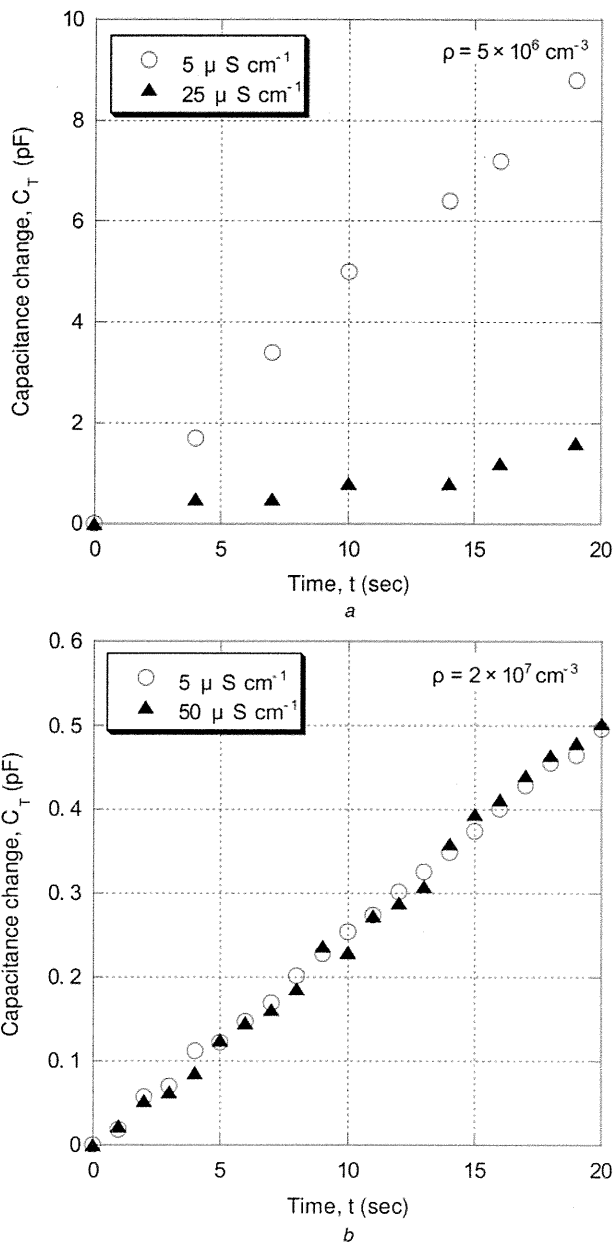


Fig. 3 DEPIM results measured with *E. coli*

a At a frequency of 100 kHz, and conductivity of $5 \mu\text{S cm}^{-1}$ (○), the capacitance increased almost linearly with time. The capacitance increase implies that bacteria were trapped and enriched under positive DEP at the electrode gap. With higher conductivity of $25 \mu\text{S cm}^{-1}$ (▲), the capacitance change became less remarkable with lower medium conductivity *b* At 800 kHz, the rate of capacitance increase with time was almost the same as for the medium conductivity of $5 \mu\text{S cm}^{-1}$ (○) and $50 \mu\text{S cm}^{-1}$ (▲) AC signal of amplitude 5 V peak–peak was applied to a smooth interdigitated electrode

factor given by

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_s^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_s^*} \quad (2)$$

where ϵ_p^* and ϵ_s^* are the complex permittivity of the particle and surrounding medium, respectively. For a real dielectric, the complex permittivity is defined as

$$\epsilon^* = \epsilon - j\frac{\sigma}{\omega} \quad (3)$$

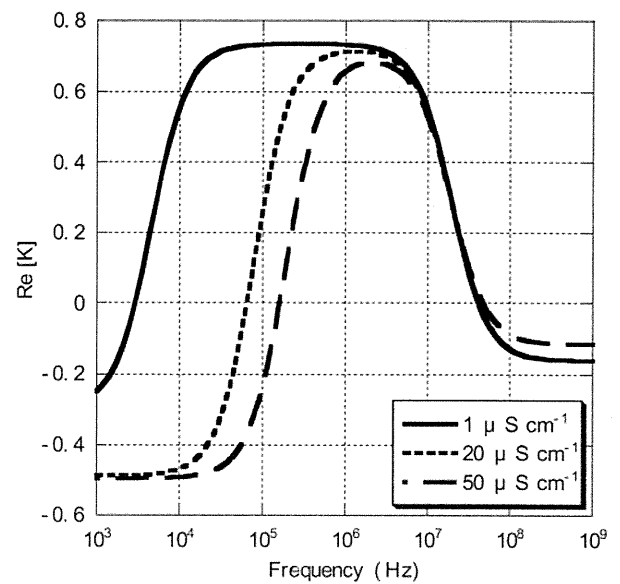


Fig. 4 Theoretical prediction of the external medium conductivity σ_s dependency of $\text{Re}[K]$ spectra

E. coli cells are modelled as a dielectric sphere covered by two shells. Parameters used in calculation are listed in Table 1

where ϵ is the permittivity and σ is the conductivity of the dielectric and ω is the angular frequency of the applied field. The effects of the conductivity of the surrounding medium on DEP force have been attributed to the modification of parameter $\text{Re}[K(\omega)]$. In general, positive-DEP force acting on bacteria decreases with a rise in the conductivity of the surrounding medium. Muller *et al.* [27] explained that DEP force is dependent on the relative magnitude of the conductivity and permittivity of cells and that of the media. From (2) and (3), one can understand that the positive DEP force decreases together with a rise in the conductivity of the medium if the conductivity of the cell and the permittivity of the cell and medium are constant.

An example of a theoretical prediction of the suspension medium conductivity dependency of parameter $\text{Re}[K(\omega)]$ is shown in Fig. 4. One *E. coli* cell is modelled as a dielectric sphere covered by shells. The shells represent the cytoplasmic membrane and the sphere covered by the shells represents the cytoplasm. The complex permittivity of the particle ϵ_p^* in (2) is replaced with an effective complex permittivity of *E. coli* cell ϵ_{eff}^* , which can be calculated by using the ‘smeared-out sphere’ model [28]. Parameter values of *E. coli* are determined referring to the referenced literature [29] and listed in Table 1. Fig. 4 indicates that $\text{Re}[K(\omega)]$ or the DEP force decreases with increases in the medium conductivity σ_s at a lower field frequency. For example, when the medium conductivity increases from the

Table 1 Parameter values used in the theoretical prediction of $\text{Re}[K(\omega)]$ shown in Figs. 4 and 5

Component	Parameter	Value
cell	radius	1 μm
cell cytoplasm	relative permittivity	60
	conductivity	0.2 Sm^{-1}
cell membrane	relative permittivity	6
	conductivity	0.25 $\mu\text{S m}^{-1}$
	thickness	8 nm
suspension medium	relative permittivity	80

initial value of 1 to $50 \mu\text{S cm}^{-1}$, the $\text{Re}[K(\omega)]$ value changes from a positive to a negative value, that is, DEP changes from positive-DEP to negative-DEP at the field frequency 100 kHz . This suggests that *E. coli* cells are not captured at the electrode gap by DEP under the condition of $50 \mu\text{S cm}^{-1}$. On the other hand, the DEP force is hardly dependent on σ_s at 800 kHz . The theoretical calculations agree well with the experimental results shown in Fig. 2 where DEP collection of *E. coli* is observed only for low medium conductivity ($1 \mu\text{S cm}^{-1}$) at 100 kHz but no clear differences are observed with a rise in medium conductivity until $50 \mu\text{S cm}^{-1}$ at 800 kHz .

As explained in the previous work [19], the conductance and capacitance increase rate as a DEPIM value strongly depend on the DEP force acting on the bacteria to be detected. The weaker the positive-DEP force acting on the bacteria, the fewer the bacteria captured at the electrode gap, resulting in decreased impedance change detected by DEPIM. Fig. 5 shows effects of the suspension medium conductivity on the DEPIM measurement as well as theoretical calculations of $\text{Re}[K(\omega)]$, which are normalised to the value at low medium conductivity ($1 \mu\text{S cm}^{-1}$). At a frequency of 100 kHz , the predicted positive-DEP force rapidly decreases with a rise in medium conductivity, changing to negative-DEP at $25 \mu\text{S cm}^{-1}$. On the other hand, at 800 kHz , the decrease in positive-DEP force is predicted to be suppressed. The measured DEPIM value agrees with these theoretical predictions at both 100 and 800 kHz . The normalised DEPIM values were around zero despite the normalised $\text{Re}[K(\omega)]$ value being around -4 under the condition of $50 \mu\text{S cm}^{-1}$, 100 kHz . In the light of the DEPIM theory, it can be understood that the DEPIM value will not be less than zero even if $\text{Re}[K(\omega)]$ is negative. These results indicate that frequency of 800 kHz

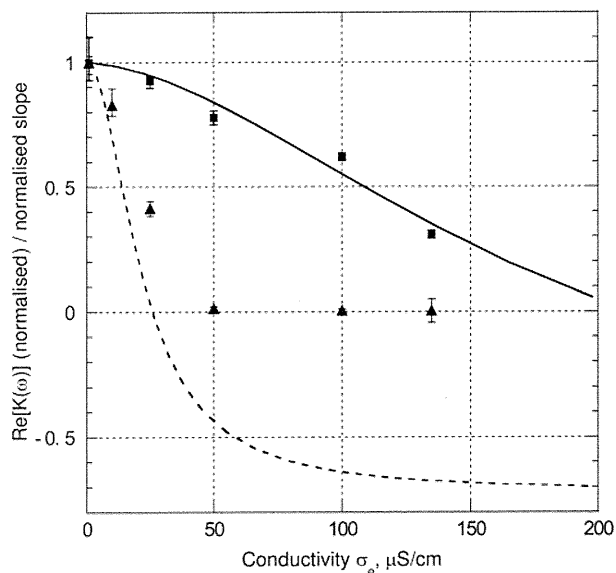


Fig. 5 Theoretical calculations of $\text{Re}[K(\omega)]$ (solid, 800 kHz ; dashed, 100 kHz) and experimental results of DEPIM at *E. coli* concentration of $5 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$ (\blacksquare , 800 kHz ; \blacktriangle , 100 kHz), these were normalised to these values at low medium conductivity ($1 \mu\text{S cm}^{-1}$)

DEPIM measurement was carried out three times under each set of conditions. The conductivity dependencies of the $\text{Re}[K(\omega)]$ and DEPIM results are almost identical, showing that the data can be employed to calibrate DEPIM results obtained for various conductivity values

is more appropriate than 100 kHz for DEPIM measurement of sample with high medium electrical conductivity, σ_s .

In order to ensure applicability of DEPIM to oral bacteria inspection, bacteria were taken from oral cavity of 49 elderly persons, and these samples were measured by DEPIM equipment. The conductivities of suspended samples for DEPIM measurement (mean \pm SD among 49 subjects) were $51 \pm 37 \mu\text{S cm}^{-1}$, and the maximum value was $144 \mu\text{S cm}^{-1}$. Considering the rather high electrical conductivity as well as the experimental and calculation results obtained for *E. coli* samples, measurement was carried out at frequency of 800 kHz .

Fig. 6 shows a relationship between the bacteria concentration obtained by the culture method and the tangent slope of capacitance change measured by DEPIM apparatus. As shown in Fig. 5, the DEPIM value changes with an increase in medium conductivity even if the bacteria concentration is the same. Therefore measured DEPIM values were calibrated based on the conductivity dependence shown in Fig. 5 so that effects of sample conductivity variation, which were difficult to control for the oral samples, could be cancelled out. Pearson's correlation coefficient was $R = 0.90$, and the range of error calculated from the standard curve obtained by the measurement data was -86 – 285% . Considering the correlation between the colony counting method and ATP bioluminescence assay ($R = 0.851$) [14] and the fluorescent counting method ($R = 0.75$) [30], correlation between DEPIM measurement and the standard culture method was significantly high.

As calculated in Fig. 4, it is predicted that stronger positive-DEP will occur in the range of MHz rather than 800 kHz under higher medium conductivity. Therefore higher field frequency will be a more suitable condition. However, a rise in the field frequency will require more careful design and probably higher cost of the impedance measurement circuit. The development of an impedance measurement circuit with a higher frequency AC source for DEP, and a current detector that can sense higher-frequency AC current accurately, will be future tasks.

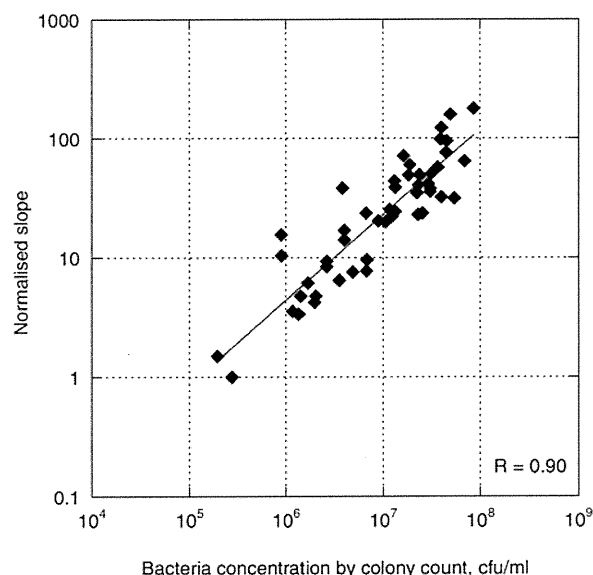


Fig. 6 Relationship between bacteria concentration determined by conventional colony counting method and tangent slope of capacitance measured by DEPIM equipment for 49 samples obtained from the human oral cavity

5 Conclusions

In this article, we have described the optimisation of AC electric field frequency in the DEPIM method to enhance the measurable range of conductivity of the sample solution to adapt the DEPIM method for the inspection of bacteria obtained from the oral cavity. The optimisation was based on the theoretical calculation of DEP force dependency on the applied field frequency in the range of the assumed medium conductivity of the sample obtained from the oral cavity. Observation of DEP-trapping process of cell was carried out to find the appropriate field frequency condition in the range of the assumed medium conductivity. Based on the investigation, the performance of the developed DEPIM apparatus was confirmed by measuring *E. coli* suspended in the medium conductivity range. By applying an AC electric field of 800 kHz, the measurable range of medium conductivity using developed apparatus was expanded up to $135 \mu\text{S cm}^{-1}$, at which point almost all samples from the oral cavity will be covered. Consequently, it was demonstrated that the apparatus is useful in the evaluation of the bacterial contamination of clinical samples from the oral cavity for quantitative evaluation of oral hygiene. In addition, the developed apparatus will be applied to other fields in which the investigation of the sample including ionic substances is necessary, for example, any clinical samples besides those taken from the oral cavity, as well as fields relating to the environment and the food industry.

6 References

- Soell, M., Hassan, M., Miliauskaite, A., Haikel, Y., Selimovic, D.: 'The oral cavity of elderly patients in diabetes', *Diabetes Metab.*, 2007, **33**, (1), pp. S10–S18
- Nikawa, H., Hamada, T., Yamamoto, T.: 'Denture plaque – past and recent concerns', *J. Dent.*, 1998, **26**, (4), pp. 299–304
- Abe, S., Ishihara, K., Adachi, M., Sasaki, H., Tanaka, K., Okuda, K.: 'Professional oral care reduces influenza infection in elderly', *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2006, **43**, pp. 157–164
- van Uffelen, R., Rommes, J.H., van Saene, H.K.: 'Preventing lower airway colonization and infection in mechanically ventilated patients', *Crit. Care Med.*, 1987, **15**, (2), pp. 99–102
- Marik, P.E.: 'Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia', *N. Engl. J. Med.*, 2001, **344**, (9), pp. 665–671
- Scannapieco, F.A., Stewart, E.M., Mylotte, J.M.: 'Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients', *Crit. Care Med.*, 1992, **20**, (6), pp. 740–745
- Yoneyama, T., Yoshida, M., Ohru, T., et al.: 'Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes', *J. Am. Geriatr. Soc.*, 2002, **50**, (3), pp. 430–433
- Kikuchi, R., Watabe, N., Konno, T., Mishina, N., Sekizawa, K., Sasaki, H.: 'High incidence of silent aspiration in elderly patients with community-acquired pneumonia', *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994, **150**, (1), pp. 251–253
- El-Solh, A.A., 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**, (5), pp. 1575–1582
- Inglis, T.J., Sherratt, M.J., Sproat, L.J., Gibson, J.S., Hawkey, P.M.: 'Gastrointestinal dysfunction and bacterial colonisation of the ventilated lung', *Lancet*, 1993, **341**, (8850), pp. 911–913
- Scannapieco, F.A.: 'Role of oral bacteria in respiratory infection', *J. Periodontol.*, 1999, **70**, pp. 793–802
- Abe, S., Ishihara, K., Adachi, M., Okuda, K.: 'Oral hygiene evaluation for effective oral care in preventing pneumonia in dentate elderly', *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2006, **43**, pp. 53–64
- Ishikawa, A., Yoneyama, T., Hirota, K., Miyake, Y., Miyatake, K.: 'Professional oral health care reduces the number of oropharyngeal bacteria', *J. Dent. Res.*, 2008, **87**, (6), pp. 594–598
- Chen, F.C., Godwin, S.L.: 'Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators', *J. Food Prot.*, 2006, **69**, (10), pp. 2534–2538
- Kepler, L., Pratt, J.R.: 'Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present', *Microbiol. Rev.*, 1994, **58**, (4), pp. 603–615
- Suehiro, J., Yatsunami, R., Hamada, R., Hara, M.: 'Quantitative estimation of biological cell concentration suspended in aqueous medium by using dielectrophoretic impedance measurement method', *J. Phys. D, Appl. Phys.*, 1999, **32**, pp. 2814–2820
- Suehiro, J., Shutou, M., Hatano, T., Hara, M.: 'High sensitive detection of biological cells using dielectrophoretic impedance measurement method combined with electroporation', *Sens. Actuators B*, 2003, **96**, pp. 144–151
- Suehiro, J., Hatano, T., Shutou, M., Hara, M.: 'Improvement of electric pulse shape for electroporation assisted dielectrophoretic impedance measurement for high sensitive bacteria detection', *Sens. Actuators B*, 2005, **109**, pp. 209–215
- Suehiro, J., Hamada, R., Noutomi, D., Shutou, M., Hara, M.: 'Selective detection of viable bacteria using dielectrophoretic impedance measurement method', *J. Electrostat.*, 2003, **57**, pp. 157–168
- Suehiro, J., Noutomi, D., Shutou, M., Hara, M.: 'Selective detection of specific bacteria using dielectrophoretic impedance measurement method combined with an antigen–antibody reaction', *J. Electrostat.*, 2003, **58**, pp. 229–246
- Pethig, R.: 'Dielectrophoresis: using inhomogeneous ac electrical fields to separate and manipulate cells', *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1996, **16**, pp. 331–348
- Hughes, M.P.: 'Ac electrokinetics: applications for nanotechnology', *Nanotechnology*, 2000, **11**, pp. 124–132
- Wang, X.-B., Huang, Y., Burt, J.P.H., Markx, G.H., Pethig, R.: 'Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells', *J. Phys. D, Appl. Phys.*, 1993, **26**, (8), pp. 1278–1285
- Abe, S., Ishihara, K., Adachi, M., Okuda, K.: 'Tongue-coating as risk indicator for aspiration pneumonia in edentate elderly', *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2008, **47**, (2), pp. 267–275
- Neyraud, E., Bult, J.H.F., Dransfield, E.: 'Continuous analysis of parotid saliva during resting and short-duration simulated chewing', *Arch. Oral Biol.*, 2009, **54**, (5), pp. 449–456
- Jones, T.B.: 'Electromechanics of particles' (Cambridge University Press, 1995)
- Müller, T., Gradl, G., Howitz, S., Shirley, S., Schnelle, Th., Fuhr, G.: 'A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles', *Biosens. Bioelectron.*, 1999, **14**, (3), pp. 247–256
- Huang, Y., Holzner, R., Pethig, R., Wang, X.-B.: 'Differences in the AC electrokinetics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies', *Phys. Med. Biol.*, 1992, **37**, (7), pp. 1499–1517
- Llamos, M., Giner, V., Sancho, M.: 'The dynamic evolution of cell chaining in a biological suspension induced by an electrical field', *J. Phys. D, Appl. Phys.*, 1998, **31**, (21), pp. 3160–3167
- Papaioannou, W., van Steenberghe, D., Cassiman, J.J., Van Eldere, J., Quirynen, M.: 'Comparison of fluorescence microscopy and culture assays to quantitate adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to mono- and multi-layered pocket epithelium cultures', *J. Periodontol.*, 1999, **70**, (6), pp. 618–625