禁無断

要介護高齢者の口腔微生物叢の改善のための歯科保健医療データバンク構築研究

平成１５年３月

財団法人８０２０推進財団

平成15年3月19日

8020推進財団特別事業

「要介護高齢者の口腔微生物叢の改善のための歯科保健医療データバンク構築研究」

報告書

研究協力者：　小澤　晃　愛知県歯科医師会常務理事
飯島　理　静岡県歯科医師会専務理事
佐藤　保　岩手県歯科医師会常務理事
植松　宏　東京医科歯科大学大学院口腔老化制御学
泉福英信　国立感染症研究所細菌第一部

研究等の目的

近年、口腔内の微生物感染症の新しい概念としてバイオフィルム感染症が提唱された。これは、歯面および口腔内組織の表層に付着した細菌などの微生物が菌体外に産生した多糖体に周囲の無機物や有機物が取り込まれて形成されるEPS（Extracellular polymeric substance）なかで微生物が増殖コロニーを維持し、歯や口腔組織の表面をフイルム状に被覆した結果として生じる感染症の一型である。この場合、EPSが微生物の付着を助長するだけでなく、バイオフィルムという増殖様式そのものが生体防御系や抗菌薬などに対する抵抗性を賦与して慢性持続感染が生ずることになる。このような口腔内の持続感染病巣から、歯周組織、口腔粘膜、扁桃、気道、そして食道等を経由して遠隔感染を生じたり、場合によっては血行性に様々な臓器での感染症を生じることとなるだけでなく、局所等で生じる免疫応答が全身性の慢性炎症性疾患の発症とその増悪に関与することとなる。

口腔バイオフィルムを形成する細菌として、齲蝕や歯周病の発症に病原性を示すグラム陽性レンサ球菌やグラム陰性桿菌の他に、真菌、腸内細菌、肺炎桿菌、肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、そしてセラチア菌なども関与する。このような多種類の菌が口腔内に多数検出される場合には、日常生活活動度の低下から口腔内清掃が不充分となっている場合だけではなく、宿主側の細菌感染に対する抵抗力の低下などが深く関わっている。過去2年間の厚生科学研究において要介護高齢者の口腔微生物叢を検討した結果、*Candida albicans*が歯垢中で38％と高率に検出され、また*Enterobacter cloacae*も歯垢中で16％と高率に検出された。*Klebsiella pneumoniae*（9％）、Pseudomonas sp.（12％）も検出された。低率であるが*Staphylococcus aureus* (MRSA; MSSA)も歯垢で検出された。歯垢細菌と歯数との相関性について検討した結

果、20本以上の歯を有する要介護高齢者からは、*C. albicans*, Pseudomonas sp., MSSAが無歯顎の高齢者より高率に検出された。また歯垢中にPseudomonas sp.が検出された要介護高齢者において、10～19本の歯を有する高齢者の心臓疾患を有する割合（71％）は、無歯顎や1～9本の高齢者（13％、25％）に比べ有意に高い事が明らかとなった。また、20本以上の高齢者（40％）よりも高率であった。

以上のことから、口腔にこれらの細菌が感染しているために歯を喪失しつつある高齢者では、全身疾患へのリスクが高い事が考えられる。しかし、この現象は加齢という基本的背景に偶発的に合併している様々な全身疾患が複合した結果である可能性は否定できず、感染している口腔細菌と個々の疾患を直接結び付けて考えることは困難である。いずれにしてもこのような病原菌が高頻度に口腔に検出されるならば、それらの菌を除去していく口腔ケアの手法を開発する必要がある。そこで、愛知県および岩手県在住の介護施設に入居している高齢者に口腔ケアを施し、その口腔内の病原菌を検討することにより、口腔ケアが菌の除去に有効であるか検討することを目的とした。

当該研究の方法

1　研究計画及び方法

1）対象者

対象者は、介護施設および在宅の要介護高齢者で愛知県、静岡県、岩手県在住（約90名）の65歳以上である。各県の詳しい介入群、非介入群の総人数、男女比、残存歯、DMFT、義歯の使用、寝たきり度判定の内訳は、表１に示す。静岡県：30人；介入群15人、非介入群15人、愛知県：27人；介入群14人、非介入群13人、岩手県：30人；介入群15人、非介入群15人。男性と女性の比率は、愛知県において静岡県および岩手県よりも男性が少なかった。残存歯は、岩手県の非介入群において岩手県介入群や静岡県と愛知県の両群よりも少なかった。寝たきり度の程度は対象者全員が「準寝たきり状態以上」である。本研究を実施するにあたって，説明書を作成し対象者や介護者に対して研究内容の十分な説明を行い（説明書：資料1），同意を得、同意文書に署名してもらう（同意書：資料2）。すべての被験者により同意を得ることができた。同意文書は、複製を行い研究責任者より保存する。

2）倫理委員会

本研究は、国立感染症研究所倫理委員会により承認を受けた。（承認番号 23）

3) 調査期間

平成 14 年 8 月～平成 15 年 2 月

4) 調査場所と調査方法

それぞれの県における、2～3の要介護施設における集団歯科検診および口腔ケア

	協力医	施設
愛知県	佐藤理之	特別養護老人ホーム　あいせの里
愛知県	野々山郁	愛厚ホーム東郷苑
愛知県	渡辺喜則	フローレンス犬山
静岡県	吉岡康治	医療法人社団清風会芹沢病院
静岡県	佐野悦夫	あしたかホーム
静岡県	若林秀典	聖稜リハビリテーション病院
岩手県	狩野裕史	アイリス花巻
岩手県	佐藤保	千年苑
岩手県	佐藤保	聖愛園

＊それぞれの施設へ県のに歯科医師会会長から依頼書（資料３）を送り、調査の協力を求め承諾を得た。

調査の段取り（資料４）

（1）歯科検診：対象者の口腔状況を把握する目的で，現在歯数と歯垢の付着程度(PlI：Plaque Index)を調べる。歯垢の付着判定はSilness と Löeの判定基準に準ずるが，測定部位は現在歯全てとして歯数あたりの平均値を算出する。なお，無歯顎者は除外する。

（2）細菌検査：口腔微生物検出のための試料（歯垢）採取は，滅菌綿棒（シードスワブ1号，栄研）を用いて対象者の左側上顎第二小臼歯，第一大臼歯および第二大臼歯相当部位の頬側歯頸部を５回拭った後に，綿棒を180度回転させてさらに同部位を５回拭うことにより行う。対象部位に歯がない者については，相当部位付近を前述の方法にて拭う。舌上サンプルも滅菌綿棒を用いて、5 回拭うことにより採取する。その後直ちに，綿棒に付属している検体保存輸送用培地に移した。検体採取後６時間以内に以下のキットを用いて，同定を行った。*Candida sp.*：カンジダチェック（ヤトロン）。

（3）口腔ケア：本研究にて行う口腔ケアは、eブラシを用いる方法とスポンジを用いる方法を行うことにする。特にeブラシの使用を主とし、eブラシの使用が難しい要介護高齢者の場合は、スポンジを用いた方法で行うことにする。また口腔ケア時に使用する洗浄液はポピドンヨード液を用いる予定であるが、その使用の難しい要介護高齢者は水を用いることとする。

A) eブラシ（資料 5）

eブラシは吸引装置を取り付けた歯ブラシで、歯ブラシの先から液が出て歯ブラシの先から吸引する歯ブラシである。すなわち、磨きながら洗浄液が出て磨いた後に出てくる汚液を磨きながら吸い込むものである。よって、eブラシを用いた口腔ブラッシング方法は、ブラッシング時に汚液が口内外に飛び出す可能性の少ない口腔清掃方法である。これは通常の歯ブラシで磨くより汚液が少なくなることから、高齢者の汚液の誤嚥が少なくなり、また口腔外への汚液の飛散防止につがることになる。その観点で限り無く少ない洗浄水の量でまたその効果が期待できる量を設定することができる。漏れることなく、1回に使用する清掃液の量は約12 ml以下に押さえることができる。

eブラシの毛先に清掃液を出す方法は、シリンジを用いた手動式で適当な時に清掃液を出すことができる。シリンジの使い方は、右ききの人には右手に歯ブラシを持ち左手に水の入ったシリンジを持つ方法でブラッシングを行うことにする。歯ブラシおよびシリンジともに自由に動かせるようにチューブを用いた接合方法を採用する。これは、ブラッシングや口腔内への清掃液の注入を自分のコントロール下に置く事で、過って水を口外へ飛散させることを防ぎ、またブラッシング時の事故を防ぐことになる。トラブルが生じた際にブラッシングを自由に中止することができるなど、全自動式よりも手動式は様々な利点があり要介護高齢者におけるブラッシング方法に適していると考えられる。

ブラッシングを行う時間は、通常 5 分間として指導を行う。しかし、要介護高齢者によって難しい場合は、間隔おいて口腔ケアを行う。口腔ケアを行う直前に介護者により6 mlの清掃液の入ったシリンジをeブラシに取り付ける。歯表面のブラッシング部位を5 分割しブラッシング部位と洗浄する時期を固定して行うことにする。1回目は左唇および頬側上下 1〜7 番、2 回目は右唇および頬側上下 1〜7 番、3 回目は左口蓋側上下 1〜7 番、4 回目は右口蓋側上下 1〜7 番、5 回目は全歯交合面を水を使わずに磨き、6 回目は全箇所を6 mlの清掃液を出し磨きながら洗浄することとする。1 回目から6 回目までで少なくとも1 回は全部の歯牙の表面部分を洗浄することにする。介護者により6 mlの清掃液の入ったシリンジを空のシリンジと交換し次の口腔ケアに備える。7 回目以降は1 回目から6 回目までの方法をくり返すことにする。12 回

目で再び全箇所を6 mlの水を出し磨きながら洗浄し、口腔ケアを終了することにする。

B) スポンジを用いた方法

eブラシを使用することが難しい（歯ブラシの毛先や土台の硬さそのものを嫌う高齢者や吸引装置から管がのびて歯ブラシに付いている形状を嫌う高齢者）要介護高齢者の場合は、スポンジを用いた方法で行う。2.5 x 2.5 x 2.5 cmの円柱形のスポンジが取り付いた棒を用いて、eブラシと同様な方法にて口腔ケアを行う。洗浄液はスポンジに染み込ませて用いることとする。

（4）調査表（資料 6）

それぞれの調査の項目について、チェックができるように調査表を作製した。調査表には被験者の基礎データに加え、口腔ケアの行った項目を記載し、調査終了時に国立感染症研究所細菌第一部泉福英信まで郵送する。

5) 結果

各県とも調査中に、若干の拒否、入院者、死者やサンプル採取が十分に行えなかった者が出て、静岡県では25人、岩手県では29人、愛知県では23人から解析可能な結果を得ることができた。各県の被験者とも、処置前のカンジダ量には大きなばらつきが認められた。測定時にカンジダが検出されなかった被験者のデータを解析に加える場合、Log10値 = 1として便宜的な計算値として行った。今回、初期値データの収集時にシードスワブチューブの紛失があり数名からデータを得ることができなかったため、静岡県では19人、岩手県では19人、愛知県では17人から初期値の平均値（静岡：Log10値 = 3.1 ± 1.5、岩手：3. 2± 1.9、愛知 3.6 ± 1.6）を算出し、愛知県が若干高い結果を得たが他の県との有意差は認められなかった。1 か月と 3 か月のみデータを有する被験者も加えて口腔ケアの効果を検討すると、静岡県では 3 か月経過しても口腔ケアの介入群で非介入群と同様に有意なカンジダへの効果は認められなかった（図 1）。愛知県においても、介入群において有意な効果は認められなかった（図 2）。岩手県においては、介入群で 1 か月よりも 3 か月において有意差はないがカンジダの減少傾向が認められた（図 3A, B）。岩手県のそれぞれ被験者の結果の内訳を検討すると、初期値、1 か月後、3 か月後ともカンジダが検出されない被験者が介入群で 7 人存在した。それらの数値は、今回の解析に加えるのは不適と考え、除いた 8 人で再計算を行ってみた。その結果、1 か月後に比べ 3 か月後は有意にカンジダが減少することが明かとなった（図 3C）。他の県では、そのような結果を得ることができなかった。

このように、岩手県においてカンジダへの口腔ケアの効果が認められたので、被

験者間の基礎データや口腔ケアの方法について静岡県との差を検討した（表2、表3）。年齢、残存歯、DMFT、義歯の使用について、岩手県と静岡県との間では有意差は認められなかった（表2）。しかし、寝たきりの程度では、岩手県は静岡県に比べ軽度（A-1)な被験者が多く、また食物残渣や舌の汚れも軽度な者が多かった。口腔ケアに関しては、静岡県で歯間ブラシの使用者が多く、岩手県では薬液を利用したうがいを行った者が多かった（表3）。

各県から、初期値でカンジダが検出され、その後1か月や3か月後のデータがそろっていて口腔ケアの方法が大きく異なっていない介入群の結果を集め、カンジダの減少が認められた効果群と効果の認められなかった不効果群に分け検討を行った（表4、表5）。口腔ケアの方法に大きな差は認められないが（表5）、効果群で不効果群よりも残存歯や健全歯が多くDMFTが少ない傾向が認められた（表4）。

考察

今回の研究は、いままで要介護高齢者の調査研究ではない統一された口腔ケアの手法を用い、また微生物検出においてより精度を向上させるためにカンジダの定量検査を行って検討を行った。カンジダは口腔に存在する常在性の菌であるものの、健康な高齢者では非常に少なく、他の菌と共に増加する傾向であるため口腔の汚れの指標として使用できる。また緑膿菌とともに口腔におけるカンジダの増加傾向が全身疾患の関与することも指摘されてため、健康の維持のためにの口腔の指標として有効である。

本研究は初年度であったため、計画書、同意書および説明書の作製や方法の調整に時間がかかり、被験者数が少なくまた3か月までしか経過観察ができなかったが、岩手県において有意な口腔ケアの効果を得ることができた。また、このような口腔ケアの効果は、寝たきりの程度が軽く、残存歯、健全歯が多く、またDMFTが低い要介護高齢者において認められる傾向であることが明かとなった。口腔ケアの手法は、eブラシに加え、舌ブラシ、歯間ブラシによるケアや薬液を用いたスポンジによるケアやうがいを要介護者の状況に合せて併用していく方法がよいと考えられた。これらの結果は、8020に到達できるように歯科治療を施し、それに加え口腔ケアを行えばより効果的に高齢者の口腔微生物叢を改善することができることを示唆している。その口腔ケアには、歯科衛生士および歯科医師によるプロフェッショナルな手法が必要と考える。今回の結果では人数が少なく十分な統計解析による結果とはいえないが、今後この研究を継続的に行っていくことにより、要介護高齢者の口腔微生物叢の改善のためのデータが蓄積され、要介護高齢者の健康に向けた口腔ケアによる歯科保健医療が構築されていくことが期待される。

研究発表

1）誌上発表

1. H. SENPUKU, A. TADA, M. TAKADA, T. SATOH, N. HANADA. Reproducibility of oral bacterial isolation in elderly. J. J. Infect. Dis. 55: 61-62. 2002.
2. Y. NOMURA, H. TAKEUCHI, H. SENPUKU, H. IDA, E. YOSHIKAWA, K. KOYAMA, N. KANAZAWA, N. HANADA. Survey of dental hygenists and health care workers for microorganisms in the oral cavity. J Infect Chemother. 8:163-167 2002.
3. H. SENPUKU, A. SOGAME, E. INOSHITA, Y. TSUHA, H. MIYAZAKI and N. HANADA. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. Gerontology 2003 in press.
4. M. KAWASHIMA, N. HANADA, T. HAMADA, J. TAGAMI and H. SENPUKU. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. Oral Microbiol. Immunol. 2003 in press.
5. 泉福英信、花田信弘：やってみよう微生物・生化学検査; 歯科微生物・生化学検査、デンタルハイジーン、22: 498-503. 2002.
6. 泉福英信、由川英二：やってみよう微生物・生化学検査; 微生物検査の実態、デンタルハイジーン、22: 504-510. 2002.
7. 野村義明、武内博朗、西川原総生、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用２；口腔バイオフィルム（歯垢）の性状と解明、デンタルダイヤモンド. 27: 46 - 49. 2002.

2）学会発表

1. 野村義明、西川原総生、泉福英信、花田信弘。口腔内日和見病原菌の検出者率調査、第76回日本感染症学会、4月11、12日、東京、p.221, 2002.(#246).
2. 竹原直道、花田信弘、熊谷崇、安細敏弘、安部井寿人、稲葉大輔、宮崎秀夫、豊島義博、野村義明、佐藤　勉、泉福英信、田中宗男、雫石聡、由川英二、口腔保健のための総合的検査項目の検討-歯科医療における臨床検査の使い方-、自由集会, 第51回口腔衛生学会総会、大阪、9月12日、2002.
3. 金子　昇、泉福英信、花田信弘、宮崎秀夫、80際高齢者における血漿中抗PAc(361-386) peptide 抗体価とDMFTとの関連、第51回口腔衛生学会総会、大阪、9月12日~9月14日、2002. 52: 450-451（D-24).
4. 安部井寿人、山口幸子、花田信弘、泉福英信、PMTC+3DSによるミュータンスレンサ球菌除菌の臨床研究、第51回口腔衛生学会総会、大阪、9月12日~9月14日、2002. 52: 514-515（E-23).

歯科検診・口腔ケアに関する説明書

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿殿

国立感染症研究所細菌一部
主任研究官　泉福 英信

要介護高齢者は日常生活活動度の低下から口腔内清掃が不充分ばかりでなく、細菌感染に対する抵抗力の低下から日和見菌を検出します。本調査では口腔ケアの手法を開発し、愛知県、静岡県、岩手県、の介護施設に入所している高齢者に口腔ケアを施し、その口腔内の病原菌を検査することにより、口腔ケアが菌の除去に有効であるか検討することを目的としています。

私たちは、上記の可能性を検討するために、8020 推進財団特別事業としまして「要介護高齢者の口腔細菌叢の改善のための歯科保健医療データバンク構築研究」を開始することとなりました。

＜本研究への協力について＞

本研究の手順を以下に説明します。口腔内の状態を検診させていただき、歯の状態、日常生活レベル，などを担当歯科医師が調査いたします。検診に要する時間は約 20 分です。口腔ケアが必要と思われた場合、開始時期を検診直後および約 12 週間後に振り分けます。振り分けは、検討に必要な一定の条件以外は無作為に行います。もし緊急の歯科治療が必要と判断された場合は速やかに治療を行います。口腔ケアの内容は患者様の状態により変わりますが、口腔ケアに関する費用は研究費により負担するため一切かかりません。この研究のたの試料は、口腔ケアの効果を判定するために口腔ケア前後で歯垢を採取します。

具体的には、まず、あなたにこの研究への協力をお願いするため、研究の内容を含め、あなたが同意するための手続きを行います。

患者様もしくはご家族が、この研究参加に同意なさらなくても、一切、不利益は起こりません。また、いったん同意されても途中で同意を取り消されることも構いません。同意を取り消したことにより治療が行われなくなることもありません。

調査結果は匿名で処理され、集計結果の統計的内容のみが公表されますので、患者様のプライバシーは保護されます。また、一切の資料は国立感染症研究所細菌一部で責任を持って管理いたします。なお，患者様個々の結果については、通常の診療の範囲で担当歯科医よりご説明をいたします。この研究に関わる個別の説明は原則的には行いません。

何かご不明の点がある場合には、担当歯科医まで遠慮無くご質問ください。

歯科検診・治療の同意書

国立感染症研究所細菌一部
主任研究官　泉福 英信

私は歯科検診・口腔ケアおよびその研究に関する説明を受け、その内容を十分に理解いたしました。
歯科検診・口腔ケアを受け、また、その調査結果を研究に使用されることにつき同意いたします。

年　　月　　日

署名　(ご本人)　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

署名　(ご家族)　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
患者様とのご関係（　　）

説明者　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

資料3

平成 14 年 8 月

施設長様

愛知県歯科医師会
会長　宮下　和人

「要介護高齢者の口腔細菌叢の改善のための歯科保健医療データバンク構築研究」

調査協力のお願い

拝啓、残暑の候、平素は格別のご高配を賜り、お礼申し上げます。
さて、今般、8020 推進財団特別事業としまして「要介護高齢者の口腔細菌叢の改善のための歯科保健医療データバンク構築研究」を開始することとなりました。

要介護高齢者は日常生活活動度の低下から口腔内清掃が不充分ばかりでなく、細菌感染に対する抵抗力の低下から日和見菌を検出します。本調査では口腔ケアの手法を開発し、愛知県、静岡県、岩手県、の介護施設に入所している高齢者に口腔ケアを施し、その口腔内の病原菌を検査することにより、口腔ケアが菌の除去に有効であるか検討することを目的としています。

以上の内容の研究ですがぜひ協力のご検討をお願い申し上げます。なお、調査内容等詳細につきましては、下記の通りです。

記

1. 調査実施期間 ： 平成 14 年 10 月 1 日～平成 15 年 3 月 20 日

2. 調 査 人 数 ： 施設につき 10 人の要介護者の調査

3. 調 査 方 法 ： 歯磨きによる誤嚥の心配のない、給排水機能付き歯ブラシを使用し、
要介護者の口腔ケアを行い、日和見菌検査を実施します。
調査期間は調査開始からおおむね 3 ヶ月で終了する予定です。
本調査で貴施設からの費用負担は一切ありません。

＊ **調査内容についてのお問い合わせ**　愛知県歯科医師会　加藤友久
TEL / FAX 052-733-9141
Email ： dtk@ma.nma.ne.jp

8020 推進財団 マニュアル

(1) 歯の診査

智歯の欠損は△としません。記入しないでください。

義歯を新しく作製する場合は△欠損としてください。義歯は⏀です。

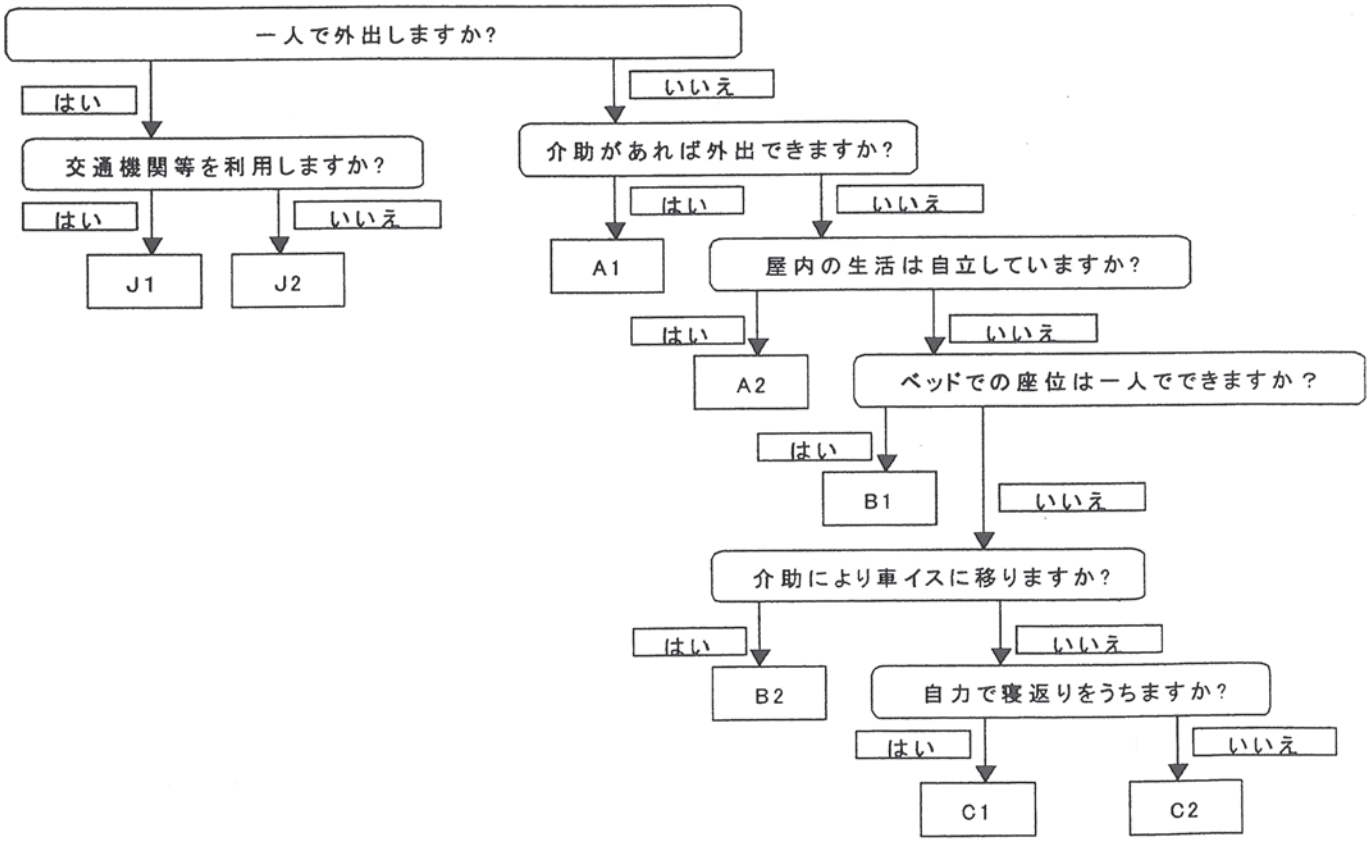
(2) 原疾患と併存症

原疾患とは要介護者となった直接の原因をいう。例えば現在は脳血管障害の治療中であるが、骨折が原因で要介護者となった場合、現疾患は骨関節疾患となり、脳血管障害は並存症である。

(3) 服用している薬

施設側で記録して頂いてください。

(4) 日常生活自立度(寝たきり度)判定基準のフローチャート



(5)カンジダの定量分析

◎歯か舌のどちらかから試料を採取します。

A. 試料採取場所の選択基準

1) 歯からの歯垢採取
- ・有歯顎者および無歯顎者で上顎総義歯を有している患者：
  → 上顎頬側 5、6、7 番歯頚部相当部の歯垢を採取します。
- ・有歯顎者の中で上顎頬側 5、6、7 番歯頚部相当部に歯を有しない患者および無歯顎者で下顎総義歯のみを有している患者：
  → 上顎頬側 5、6、7 番からは採取できないので、その他の 2～3 歯の歯頚部相当部から歯垢を採取します。

2) 舌からの舌上唾液採取
- ・無歯顎者で総義歯を有していない患者
- ・残存歯が 1 本か残存歯すべてが残根により歯垢採取不可能の患者

B. 方法

1) 歯垢の採取方法

1. 滅菌キャップ付き綿棒（シードスワブ 1 号*）の入ったビニール袋をキャップ側から開け、右手でキャップを軽く持ち綿部分が他に触れないようにシードスワブを袋から取り出します（図 1）。
   ＊ 注文により株式会社 BML から郵送されてきたビニール袋にはサンプル採取用綿棒（シードスワブ 1 号）と運搬用寒天入りチューブが入っています。

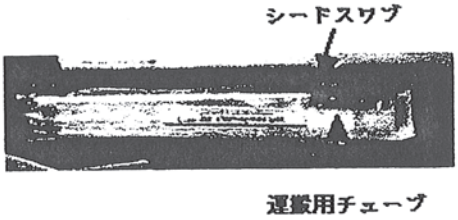


図 1 シードスワブと運搬用チューブ

2. 患者の左側口角を左手で持ったミラーで少し広げ、綿部分が口唇や口腔粘膜に触れないように左側上額頬側 5 番歯頚近心部まで到達するよう綿棒を挿入していきます。
3. その歯頚部に綿をあてて、5 から 7 番遠心まで歯頚部をなぞるようにまた綿棒が少したわむ程度の力で 5 往復します（図 2）。この時に綿部分が頬粘膜になるべく触れないことに注意します。

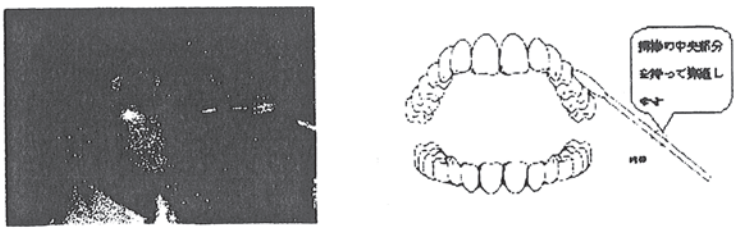


図 2 シードスワブによる歯垢採取

4. さらに綿棒を 180 度回転し、使用していない新しい綿部分で同様に 5　往復します。
5. 採取終了後、運搬用チューブのフタをとり綿部分が運搬用チューブ内の寒天に漬かるように綿棒を指し込み、綿棒のキュップがチューブのフタ代わりにはまるよう完全に止まるまで押し込みます（図 3）。

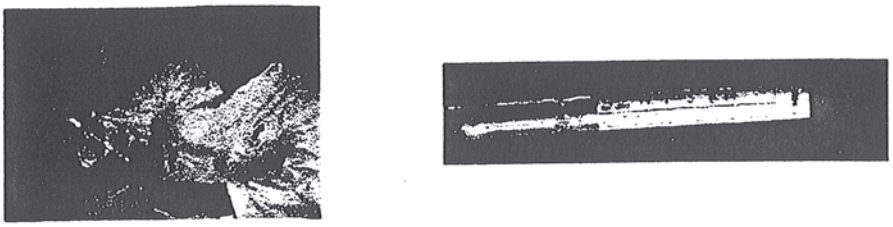


図 3　シードスワブを運搬用チューブに挿入

2）舌上唾

液採取：

1. 患者に口を開け舌を前方へ出すように声をかけます。
2. 歯垢採取と同様の方法で綿棒を取り出し、舌尖から約 2/3 部分の舌背を場所を変えながら 2～3cm の範囲で、綿棒が少したわむ程度の力で 3 回往復します。綿棒を 180 度回転し、使用していない新しい綿部分で同様に 3 回往復します。
3. 採取終了後、 歯垢採取と同様に綿棒を運搬用チューブに押し込みます。

C. 試料の輸送

チューブを封筒（BML から郵送されてきます。）に入れ、その日にうちにポストへ投函します（図 4）。郵送するまでの間は冷蔵の環境が望ましいが、冷蔵庫などがない場合は直射日光を避け、箱へ入れるか日陰に置くようにします。

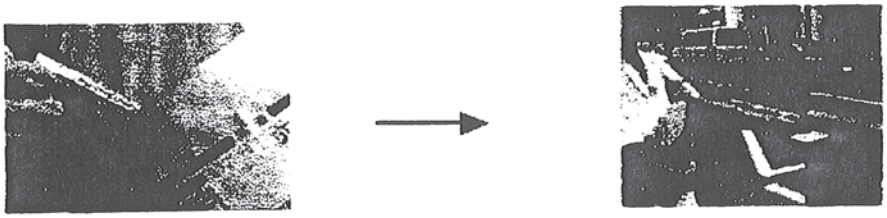


図4　運搬用チューブを入れた封筒の投函

D. 採取時期：

初回診査後と最終診査（治療終了）後の 2 回

E. データの記載：

調査表に記入する事項は、歯、舌のどちらから採取したかだけで、採取したほうに○を記入します。

カンジダの測定値は、結果が株式会社 BML から送られてきた後に記載します。

マイナスはいりません）を調査票に記録してください。

介護の歯ブラシ

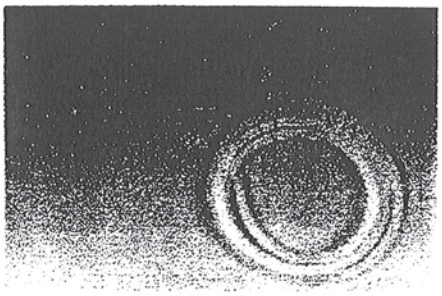
TV e - Brush®

給・排水機能付歯ブラシ

PAT.P.

TV e - Brush。

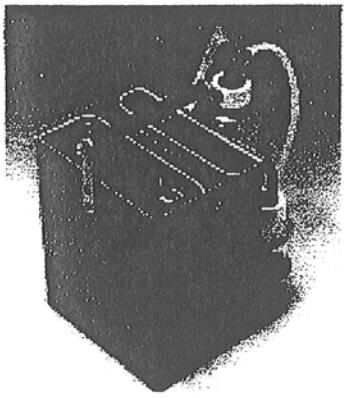
ヘッド：形状……幅10×長さ25×厚さ7㎜
M……標準
※別型でS…軟質、SS…Sより軟質ができます。



イーブラシに給水・吸引チューブを接続

給水・排水機能付手用歯ブラシ TV e - Brush。は、歯磨き時に喉への水、汚水などの流入を防ぎ、短時間で安全に効率的な口腔清掃が行えます。

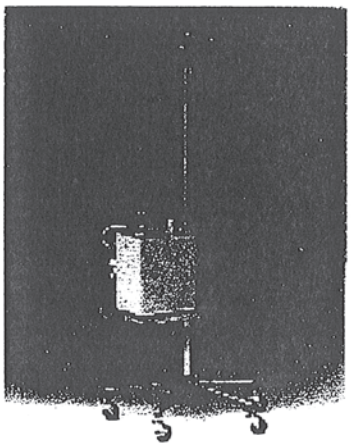
- イーブラシの歯磨きに洗口剤、フッソ洗口剤等も使用出来ます。
- イーブラシは給水しながら歯を磨き、同時に洗浄汚水はYM-2000Tによって排除されます。
- 歯磨き中の洗浄汚水は口腔にたまることはありません。
- イーブラシはどんな体位でも使用出来ます。
- 給水は、給水ボトル（ガートル架入用）及プラスチックシリンジが使用できます。



YM-2000T吸引器

TV e - Brush。専用の吸引器です。
簡単多目的で痰、鼻汁、涎等の吸引にも使用できます。

SUCTION YM-2000T
小型吸引器



YM-2000T架台

YM-2000T専用架台です。
イルリガートルとしても使用できます。

仕　様

	YM-2000T
電　源	AC100V　50/60Hz
消費電力	50W
外寸法	W210×D165×H260㎜（架台）
重　量	6.5kg

SANTO

要介護高齢者の口腔細菌叢の改善のための歯科保健医療データバンク構築研究

調 査 表

調査表の問い合わせ

愛知県歯科医師会
加藤友久
電話/ FAX 052-733-9141
Email dtk@ma.nma.ne.jp

愛知県歯科医師会

国立感染研究所細菌第一部

TK I－3 02/07/20

平成 14 年度　　施設名：

調査開始時診査日　　年　月　日	患者氏名/ふりがな	男	明治・大正・昭和	調査者氏名	
調査終了時診査日　　年　月　日		女	年　月　日		
入所年月日　西暦　　年　月　日	入所前の居住地	自宅・病院・老人保健施設・特別養護老人ホーム・その他 [　　]			

県名：　該当県に○　　岩手県 [　　]　静岡県 [　　]　愛知県 [　　]

(1) 歯の診査

調査開始時																	
右	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8	左
	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8	
調査開始時																	

＼	／健全歯	C未処置歯	○処置歯	△欠損	⊜欠損補綴	※義歯は⊜です。 ※智歯の欠損は△としません。記入しないでください。 ※義歯を新しく作製する場合は△欠損としてください。

(2) 原疾患と併存症 * 原疾患は[A]一つのみ、併存症は[B1] [B2] [B3]として重複回答が可能です。

疾患名
[　]脳梗塞・[　]脳出血・[　]多発性脳血管障害・[　]クモ膜下出血・[　]その他の脳卒中（　　）
[　]脳血管性痴呆・[　]アルツハイマー病・[　]パーキンソン症候群（パーキンソン病を含む）
[　]大腿骨頸部骨折・[　]脊椎圧迫骨折
[　]変形性脊椎症
[　]変形性関節症・[　]慢性関節リウマチ
[　]心疾患・[　]呼吸器疾患
[　]糖尿病
[　]老衰・[　]その他（　　）
上記[A]疾患の発生日　　西暦　19　　年　　月　　日

(3) 服用している薬　全種類を記載してください。

(4) ADL（日常生活活動）②寝たきり度判定（厚生省）：いずれかに○を記入してください。

		調査開始時	調査終了時			
J	1			生活自立	ランクJ	何らかの障害を有するが、日常生活の自立は自立しており独力で外出する 1. 交通機関を利用して外出 2. 近隣所へなら外出
	2					
A	1			準寝たきり	ランクA	屋内での生活は概ね自立しているが、介助なしには外出しない 1. 介助により外出、日中はほとんどベッドから離れて生活 2. 外出の頻度は少なく、日中も寝たきりの生活をしている
	2					
B	1			寝たきり	ランクB	屋内でも生活は何等かの介助を要し、日中もベッド上での生活が主体であるが座位を保つ 1. 車椅子に移乗し、食事、排泄はベッドから離れて行う 2. 介助により車椅子に移乗する
	2					
C	1				ランクC	一日中ベッドの上で過ごし、排泄、食事、着替えにおいて介助を要する 1. 自分では寝返りをうつ 2. 自分では寝返りをうたない
	2					

(5) カンジダの定量分析

◎歯か舌のどちらかから試料を採取します。

	回答欄					
	サンプル採取（チェック欄）			測定値（後で記入）		
	調査開始時	1ヶ月後	3ヶ月後	調査開始時	1ヶ月後	3ヶ月後
歯						
舌						

(6) 口腔情報　　回答欄へ回答肢から選択した番号を記入してください

	回答肢	回答欄		
		調査開始時	1ヶ月後	3ヶ月後
1）口腔清掃状況	1. きれい 2. 普通、 3. 磨き残しあり			
2）歯肉の状況	1. 健康 2. 歯肉炎 3. 歯周炎			
3）義歯の使用状況	1. 問題なし 2. 破損、 3. その他 ※			

※ その他の場合、具体的に記録してください。例：義歯新製中

(6) 口腔ケア内容 vol1.　　※　実施した項目に○を記入する

処置内容			月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日
口腔ケア関係	※標準的方法の実施												
	実施した口腔ケアの内容（標準的方法でない場合）	手用歯ブラシ											
		電動歯ブラシ											
		歯間清掃器具（歯間ブラシ、フロス）											
		口腔ケア用スポンジによる清拭：薬液(+)											
		口腔ケア用スポンジ）による清拭：薬液(−)											
		舌清掃											
		うがい：薬液(+)											
		うがい：薬液(−)											
		義歯の清掃											

※標準的方式：座位にて1日1回の下記に示す口腔ケアを1回5分以内で行う

① 含嗽薬浸漬口腔清掃スポンジにて口腔粘膜を擦りとる（1分）、
② 歯（舌）ブラシにて舌の奥から手前へ 10 回軽く擦り、舌苔を擦りとる（30 秒）、
③ e ブラシにて歯面清掃、粘膜も必要に応じて清掃する（2.5 分）、
④ 含嗽薬（イソジンガーグル：0.25% ポビドンヨード）にて口洗（1分）

口腔ケア内容 vol 2.　　上記表と同じものです。上記表から使用してください。

処置内容			月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日
口腔ケア関係	※標準的方法の実施												
	実施した口腔ケアの内容（標準的方法でない場合）	手用歯ブラシ											
		電動歯ブラシ											
		歯間清掃器具（歯間ブラシ、フロス）											
		口腔ケア用スポンジによる清拭：薬液(+)											
		口腔ケア用スポンジ）による清拭：薬液(−)											
		舌清掃											
		うがい：薬液(+)											
		うがい：薬液(−)											
		義歯の清掃											

口腔ケア内容 vol 3.　　上記表と同じものです。上記表から使用してください。

処置内容			月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日
口腔ケア関係	※標準的方法の実施												
	実施した口腔ケアの内容（標準的方法でない場合）	手用歯ブラシ											
		電動歯ブラシ											
		歯間清掃器具（歯間ブラシ、フロス）											
		口腔ケア用スポンジによる清拭：薬液(+)											
		口腔ケア用スポンジ）による清拭：薬液(−)											
		舌清掃											
		うがい：薬液(+)											
		うがい：薬液(−)											
		義歯の清掃											

口腔ケア内容 vol 4.　　上記表と同じものです。上記表から使用してください。

処置内容			月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日	月日
口腔ケア関係	※標準的方法の実施												
	実施した口腔ケアの内容（標準的方法でない場合）	手用歯ブラシ											
		電動歯ブラシ											
		歯間清掃器具（歯間ブラシ、フロス）											
		口腔ケア用スポンジによる清拭：薬液(+)											
		口腔ケア用スポンジ）による清拭：薬液(−)											
		舌清掃											
		うがい：薬液(+)											
		うがい：薬液(−)											
		義歯の清掃											

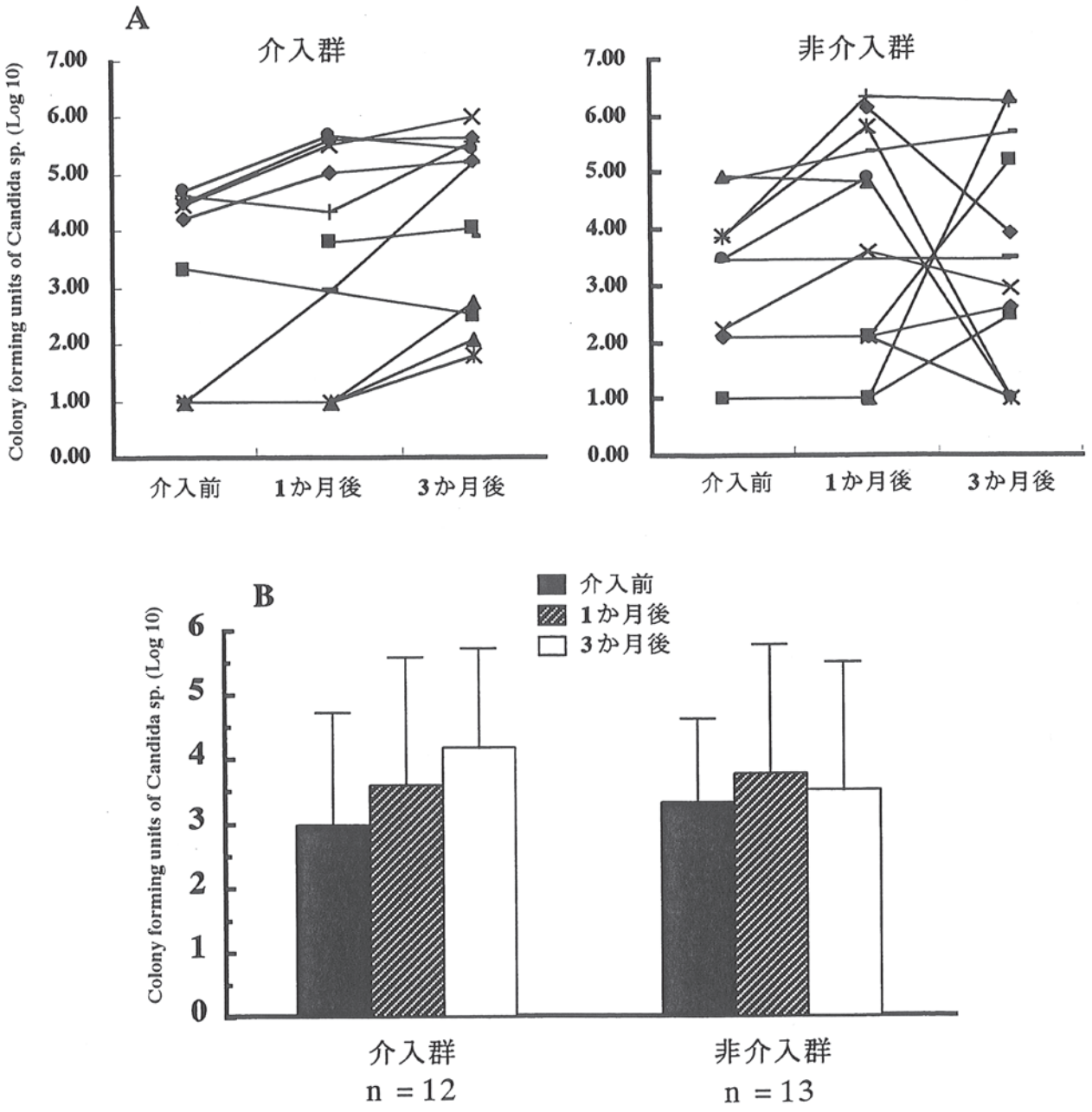


図１　静岡県の要介護高齢者における口腔ケアの効果

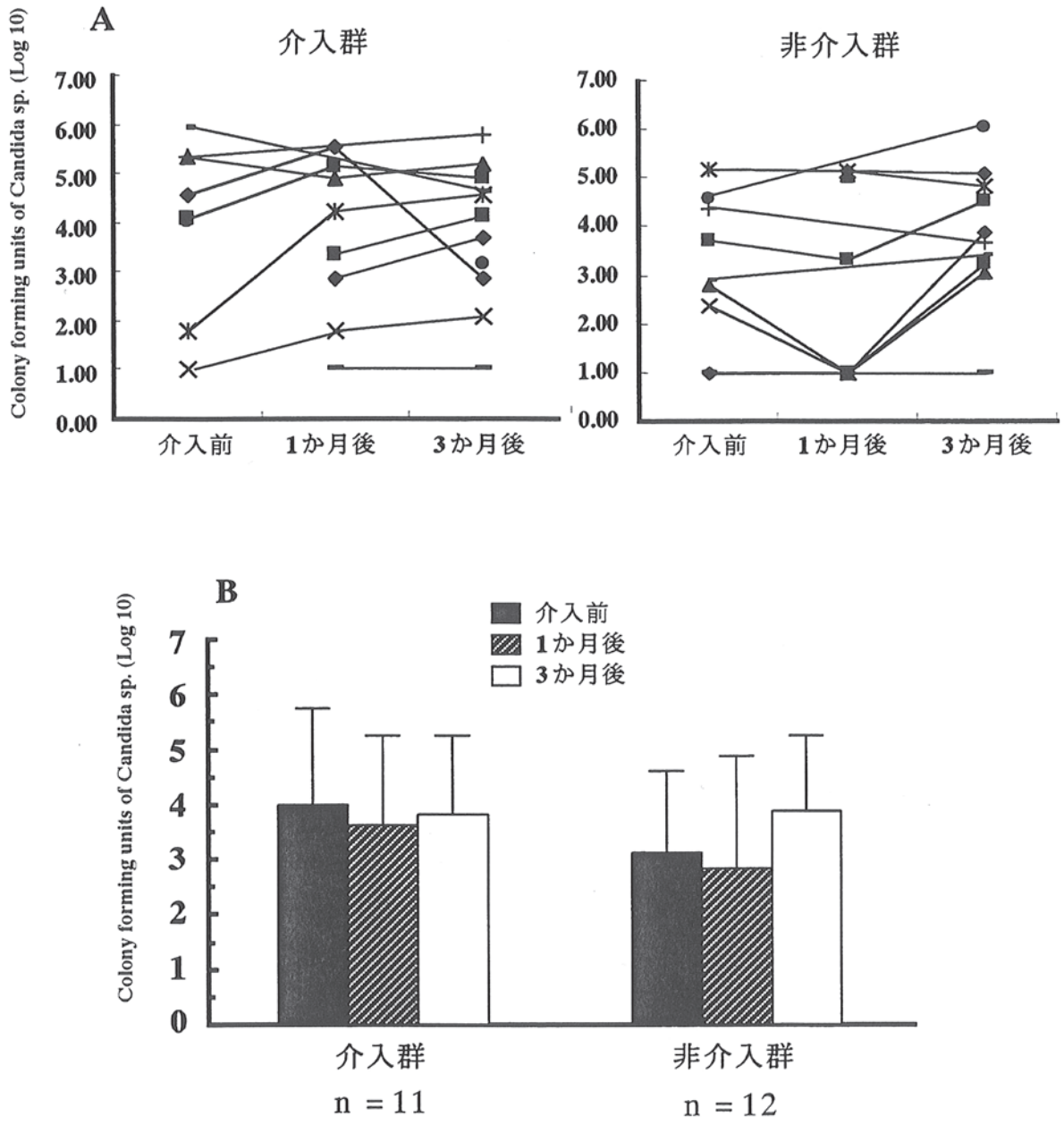


図２　愛知県の要介護高齢者における口腔ケアの効果

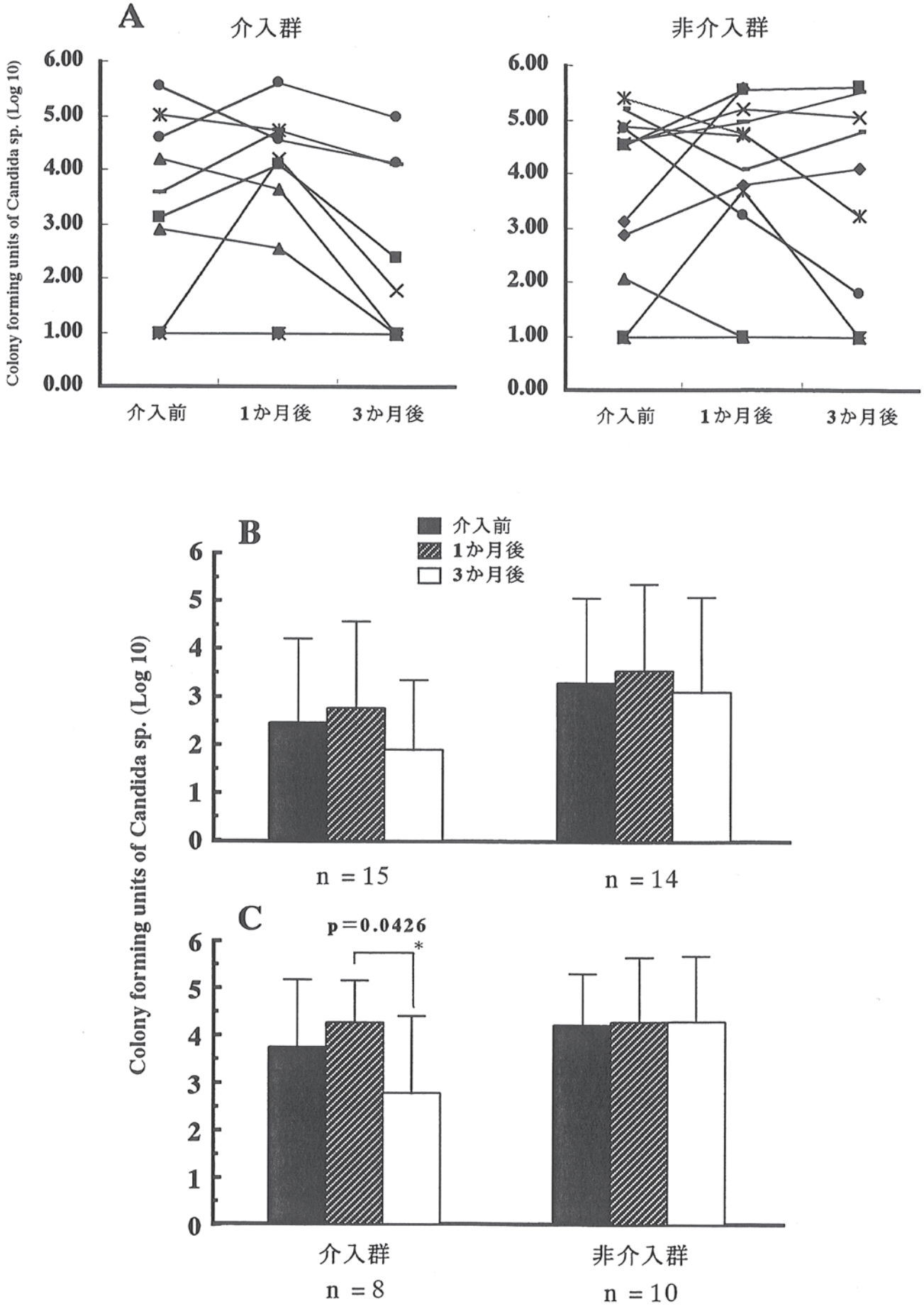


図３　岩手県の要介護高齢者における口腔ケアの効果

表1　各3県の被験者の基礎データ

	男性：女性	年齢	残存歯	DMFT	義歯の使用	寝たきり度					
						A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2
静岡：介入	5：10	81.4±8.5	17.2±7.4	21.0±6.1	4/15 (27%)	2	1	3	6	0	2
非介入	5：10	83.3±8.5	17.4±8.4	22.1±5.8	3/15 (20%)	2	1	2	1	3	5
愛知：介入	2：12	79.6±8.0	12.7±7.1	23.0±5.5	9/14 (64%)	1	1	5	2	3	2
非介入	2：11	79.5±7.5	16.1±7.0	22.8±5.1	11/13 (85%)	2	1	6	3	1	0
岩手：介入	6：9	79.3±8.5	13.9±8.1	24.3±5.7	6/15 (40%)	8	1	1	0	0	5
非介入	6：9	82.7±9.2	7.0±7.1	26.8±2.8	5/15 (33%)	7	2	0	2	1	3

表2　静岡県と岩手県の介入群の比較

	人数	年齢	残存歯	DMFT	義歯の使用	口腔ケアの効果			寝たきり度	食物残渣	舌の汚れ
						処置前	1か月後	3か月後			
静岡	10	82.8±7.4	14.3±7.1	22.6±6.2	4/10 (40%)	3.0±1.7	3.9±2.0	4.3±1.7	B-2が5人	2.0±1.2	1.9±1.0
岩手	8	80.9±7.2	15.1±7.4	24.6±7.0	3/8 (38%)	3.8±1.4	4.3±0.9	2.8±1.6	A-1が5人	2.8±1.0	2.3±0.7

表3　静岡県と岩手県の介入群の比較様々な口腔ケア

	eブラシ	手用歯ブラシ	電動歯ブラシ	舌ブラシ	歯間ブラシ	スポンジ（薬液+）	スポンジ（薬液-）	うがい（薬液+）	うがい（薬液-）	義歯の洗浄
静岡	10/10 (100%)	8 (80%)	5 (50%)	7 (70%)	10 (100%)	5 (50%)	4 (40%)	2 (20%)	3 (30%)	4 (40%)
岩手	6/8 (75%)	4 (50%)	3 (38%)	4 (50%)	3 (28%)	5 (63%)	0 (0%)	5 (63%)	0 (0%)	2 (25%)

表4　口腔ケア効果群と効果のない群との比較

	人数	年齢	残存歯	健全歯	DMFT	義歯の使用	食物残渣	舌の汚れ
不効果群	9	81.9±5.3	10.4±6.3	2.1±3.8	26.2±2.9	5/9 (56%)	2.1±1.1	2.0±0.9
効果群	8	80.8±6.9	15.1±7.5	6.4±7.9	21.6±7.9	3/8 (38%)	2.0±0.9	1.8±0.7

表５　口腔ケア効果群と効果のない群との口腔ケアの比較

	eブラシ	手用歯ブラシ	電動歯ブラシ	舌ブラシ	歯間ブラシ	スポンジ（薬液+）	スポンジ（薬液-）	うがい（薬液+）	うがい（薬液-）	義歯の洗浄
不効果群	9/9 (100%)	6 (67%)	3 (33%)	6 (67%)	7 (78%)	4 (44%)	1 (11%)	4 (44%)	0 (0%)	5 (56%)
効果群	6/8 (75%)	7 (88%)	4 (50%)	5 (63%)	6 (75%)	6 (75%)	1 (13%)	5 (63%)	0 (0%)	2 (25%)

Jpn. J. Infect. Dis., 55, 2002

Laboratory and Epidemiology Communications

Reproducibility of Oral Bacterial Isolation in the Elderly

Hidenobu Senpuku*, Akio Tada[1], Masanari Takada[2], Tsutomu Sato[2] and Nobuhiro Hanada[3]

Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, and [3]Department of Oral Health, National Institute of Public Health, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, [1]Chiba City Health Center, Saiwai 1-3-9, Mihama-ku, Chiba 261-8755 and [2]Department of Preventive and Community Dentistry, Nippon Dental University, Fujimi 1-9-20, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159

Communicated by Haruo Watanabe

(Accepted June 7, 2002)

Aspiration pneumonia is a major cause of death among elderly persons (1) because dysphagia and decreased cough reflex are often associated with aging. Oral bacterial flora is an important factor of the occurrence of aspiration pneumonia (2). Oral bacterial flora is composed of both aerobic and anaerobic bacteria species due to the complex structure of the oral cavity. Data regarding pathogenic aerobic bacteria in the oral cavity of the elderly (3) and the association of periodontal disease-causing anaerobic bacteria with pneumonia (4) have been reported. This report focuses on the detection rates of oral anaerobic bacteria measured at two different times in elderly subjects.

Thirty-three elderly people (73.4 ± 5.6 year-old in average), 12 males and 21 females, from Saitama Prefecture were enrolled in the present study which was conducted in July and August, 2001.

Samples were taken from dental plaque on the upper molar teeth or upper molar portions of dentures. The plaque samples were placed in transport fluid (0.4% agar, 0.15% thioglycollate/phosphate buffered saline) and sent to Bio Medical Laboratory (Tokyo) for analysis. For the detection and identification of aerobic bacteria species, each sample was poured directly onto chocolate agar, OPA staphylococcus, and Drigalski agar plates (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd., Tokyo) using a stick. The plates were incubated in an atmosphere of 5% CO_2 in H_2 gas at 37°C for 24-48 h. Representative microbial colonies from each plate were examined for appearance, gram stain, hemolytic, catalytic, and oxidase reaction characters

Table 1. Detection rate of microbial pathogens in dental plaque from the elderly

(1) aerobic microorganisms

	No. positives at 1st exam (% total) (I)	No. positives at 2nd exam among positives at 1st exam (II)	II/I (%)
Candida sp.	14 (42.4)	7	7/14 (50.0)
Haemophilus parainfluenzae	13 (39.4)	4	4/13 (30.8)
Acinetobacter calcoaceticus	10 (30.3)	4	4/10 (40.0)
Corynebacterium sp.	7 (21.2)	2	2/7 (28.6)
Bacillus sp.	6 (18.2)	2	2/6 (33.3)
Enterobacter cloacae	4 (12.1)	0	0/4 (0)
Coagulase (-) *Staphylococcus*	4 (12.1)	1	1/4 (25.0)
Klebsiella pneumoniae	4 (12.1)	1	1/4 (25.0)

(2) anaerobic bacteria species

	No. positives at 1st exam (% total) (I)	No. positives at 2nd exam among positives at 1st exam (II)	II/I (%)
Capnocytophaga sp.	23 (69.7)	23	23/23 (100)
Prevotella melaninogenica	22 (66.7)	12	12/22 (54.5)
Prevotella oris	10 (30.3)	9	9/10 (90.0)
Fusobacterium nucleatum	10 (30.3)	9	9/10 (90.0)
Prevotella intermedia	7 (21.2)	7	7/7 (100)
Fusobacterium necrophorum	5 (15.2)	3	3/5 (60.0)
Prevotella denticola	3 (9.1)	3	3/3 (100)
Fusobacterium sp.	3 (9.1)	0	0/3 (0)

*Corresponding author: Tel: +81-3-5285-1111, Fax: +81-3-5285-1172, E-mail: hsenpuku@nih.go.jp

(5). The bacteria identified were methicillin-sensitive (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), (detected by PS latex, rabbit plasma, and MRSA screening plates [Nippon Becton Dickinson]), *Pseudomonas* sp. (detected by VITEK [BioMerieux Vitek Japan, Tokyo]), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) (detected by a Haemophilus ID4 plate (Nippon Becton Dickinson), and *Candida* sp. (detected by Candida check [Intron Laboratories, Inc., Tokyo]). For detection and identification of anaerobic bacteria, each sample was poured directory onto an HK agar plate and incubated for 48-72 h under anaerobic conditions using a gas pack system. Representative microbial colonies from each plate were gram stained and isolated using a RapID ANAII system (AMCO, Tokyo).

The detection rates of microorganisms from dental plaque are shown in Table 1. In the first examination, *Candida* sp. and *H. parainfluenzae* were most frequently detected aerobic microorganisms. Of the anaerobic species, *Capnocytophaga* sp. and *Prevotella melaninogenica*, were isolated from more than two-thirds of the subjects. The detection rate of *P. oris* and *Fusobacterium nucleatum* was 30%. Most of the subjects enrolled in this study had at least one of the four major pathogenic anaerobes, *Capnocytophaga* sp., *P. melaninogenica*, *P. oris*, and *F. nucleatum*.

A second examination was performed a month later. Less than half of the subjects retained the same aerobic species detected in the first examination, while more than half retained anaerobic species (except *Fusobacterium* sp.) detected in the first examination. Anaerobes appeared more stable in the elderly persons' oral flora than did aerobes probably because of the biofilm in the oral cavity which provides anaerobes with an optimal environment.

REFERENCES

1. Teasell, B. W., McRae, M., Marchuk, Y. and Finestone, H. M. (1996): Pneumonia associated with aspiration following stroke. Arch. Phys. Med. Rehabil., 79, 707-709.
2. Pinto, A., Yanai, M., Nakagawa, T., Sekizawa, K. and Sasaki, H. (1994): Swallowing reflex in the night. Lancet, 344, 820-821.
3. Salam, M. A., Senpuku, H., Nomura, Y., Matin, K., Miyazaki, H. and Hanada, N. (2001): Isolation of opportunistic pathogens in dental plaque, saliva and tonsil samples from elderly. Jpn. J. Infect. Dis., 54, 193-195.
4. Frank, A.S. (1999): Role of oral bacteria in respiratory infection. J. Periodontol., 70, 793-802.
5. Murray, R. G. E., Brenner, D. J., Bryant, M. R., Holt, J. G., Krieg, N. R., Moulder, J. W., Pfennig, N., Sneath, P. H. A., Steley, J. T. and Williams, S. T. (1989): Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. vol. 1-vol. 4. Williams & Wilkins, Baltimore.

J Infect Chemother (2002) 8:163–167 © Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases 2002

ORIGINAL ARTICLE

Yoshiaki Nomura · Hiroaki Takeuchi · Hidenobu Senpuku
Hiroshisa Ida · Eiji Yoshikawa · Keiko Koyama
Noriko Kanazawa · Nobuhiro Hanada

Survey of dental hygienists and healthcare workers for microorganisms in the oral cavity

Received: June 21, 2001 / Accepted: February 20, 2002

Abstract Over 350 bacterial species are known to form communities on tooth surfaces in the oral cavity, and opportunistic pathogens are frequently isolated from samples taken from the oral cavities of immunocompromised hosts, as well as elderly people with poor oral hygiene. To confirm the correlation between the prevalence of opportunistic pathogens in the oral cavity and oral hygiene, dental plaque and saliva samples from 15 dental hygienists and 15 healthcare workers were investigated. No opportunistic pathogens were found in the samples from dental hygienists, however, they were isolated from 10 of the 15 healthcare workers (66.7%). The total amounts of *Streptococcus* sp. and *Lactobacillus* sp. were also significantly higher in the healthcare workers. The amount of *Streptococcus mutans* was also higher, although the difference was not significant. From our results, we concluded that the prevalence of opportunistic pathogens and cariogenic bacteria in the oral cavity may be reduced by proper oral hygiene measures.

Key words Opportunistic pathogen · Mutans streptococci · Lactobacilli · Oral hygiene

Introduction

It has been reported that more than 350 bacterial species may inhabit the oral cavity,[1] including some opportunistic pathogens that cause clinical manifestations, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*.[2–5] Oral biofilm is produced by the sequential attachment of a number of bacteria, and is dependent on both species type and surface composition. These attaching bacteria are able to accumulate on oral surfaces. Changes in oral microflora that are related to poor oral hygiene include an increase in the prevalence of some opportunistic pathogens, and this has an effect on compromised hosts and elderly people, resulting in biofilm formation that includes such pathogens.[4,6,7] Interestingly, opportunistic pathogens that showed high concentrations of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* sp. in the oral cavity were detected in preschool children, but not in children who had received education regarding oral hygiene.[8]

In recent studies, some oral hygiene measures have been suggested to reduce the number of pathogenic microbes in the oral cavity.[9–11] The employment of oral hygiene measures may be an effective strategy for preventing cross-infection of workers and patients. With this in mind, we investigated the relationship between oral hygiene measures and the prevalence of opportunistic pathogens in healthcare workers and dental hygienists, in order to evaluate the correlation of the prevalence of these microbes and oral hygiene.

Subjects and methods

Subjects

Fifteen female dental hygienists, whose main work was to perform medical checkups, and 15 healthcare workers (12 females, 3 males), who cared for elderly institutionalized residents in a facility, were studied. The mean ages were 30.3 ± 8.8 years for the dental hygienists and 43.6 ± 13.1 years for the healthcare workers. Data were collected regarding demographics, medical status, the oral hygiene methods used, and smoking habits (see Table 1).

Y. Nomura · H. Takeuchi · H. Senpuku · N. Hanada (✉)
Department of Oral Science, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan
Tel. +81-3-5285-1111; Fax +81-3-5285-1172
e-mail: nhanada@nih.go.jp

H. Ida · E. Yoshikawa
BML Co. Ltd., Tokyo, Japan

K. Koyama · N. Kanazawa
Japanese Foundation for Oral Health Promotion, Tokyo, Japan

Table 1. Demographics of study subjects

	Dental hygienists	Healthcare workers	*P* Value
Age (years; mean ± SD)	30.3 ± 8.8	43.6 ± 13.1	0.050
Number of DMFT (mean ± SD)	9.9 ± 6.6	12.1 ± 4.1	0.919
Smoking			
Yes	0	6	0.017
No	15	9	
Daily oral care (times a day)			
0	0	0	0.050
1	0	0	
2	1	9	
3	14	6	
Mouthwash usage			
Yes	0	3	0.100
No	15	12	
Interdental brush or dental floss usage			
Yes	15	8	0.006
No	0	7	

A two-tailed Mann-Whitney U test was used to assess age and decayed, missing, and filled teeth (DMFT) results. A two-tailed Fisher's exact test was used to assess smoking habit, times of daily oral care, mouthwash usage, and interdental brush or dental floss usage results

Sampling procedures

Before samples were taken, informed verbal consent was obtained. The subjects were prohibited from eating or drinking for at least 2h before the clinical sampling, and then 5-min paraffin-stimulated whole saliva samples were collected. To obtain plaque samples, cotton sticks were used to scrape the surface of the right upper molar five times.

Microbial procedures

The plaque samples were taken, in transport fluid, to Bio Medical Laboratory (Tokyo, Japan) for analysis. There, each sample was placed directly onto chocolate agar, blood agar, OPA staphylococcus, and drigalski agar plates (Nippon Becton Dickinson, Tokyo, Japan), using a stick. The plates were incubated in an atmosphere of 5% CO_2 in H_2 at 37°C for 24–48h. Representative microbial colonies from each plate were Gram-stained and isolated by identification, using their characteristic appearance, hemolytic features, catalytic reaction, and oxidase reaction.[12] Organisms known to be responsible for pneumonia were chosen for study, and these species, found in a majority of the subjects, were suspended in 1ml of 0.5% saline, gently shaken, and tested in microbial detection kits. The following bacteria and fungi were identified in the detection plates: *S. aureus* (methicillin-sensitive [MSSA] and -resistant [MRSA]), by PS latex, rabbit plasma, and an MRSA screening plate (Nippon Becton Dickinson); *Pseudomonas* sp., by Vitek (BioMérieux Vitek Japan [BVJ], Tokyo, Japan); β-haemolytic streptococcus, with a Seroidenstrepto kit (Eiken, Tokyo, Japan), API strepto (BVJ), and Vitek (BVJ); *Streptococcus pneumoniae*, by a Streptococcus identification disk (Nippon Becton Dickinson); *Haemophilus influenzae* by a Haemophilus ID4 plate (Nippon Becton Dickinson); *Serratia marcescens* by Vitek (BVJ); and Candida sp., using a Candida check (Latron Laboratories, Tokyo, Japan). The level for detection of each organism type was determined according to the manufacturer's instructions.

To evaluate the total numbers of streptococci, *S. mutans*, and *Lactobacillus* sp in saliva, 50-μl samples were sonicated by ultrasonic dispersion (60-W power output) for 10s and poured onto Mitis-Salivarius agar plates (MS; Gibco, Tokyo, Japan) for total streptococci, improved Mitis-Salivarius agar plates containing 0.02M bacitracin (MSB; Wako, Osaka, Japan) for *S. mutans*,[10] and Rogosa SL agar plates for *Lactobacilli* sp., using an Eddy Jet spiral system (Gunze Sangyo, Tokyo, Japan), and then incubated anaerobically for 48h. Following incubation, the number of colonies on each agar plate was detected by their characteristic appearance, and the number of bacteria per ml of whole saliva was calculated.

Statistical analysis

A two-tailed Fisher's exact test was used to assess the categorical variables. A two-tailed Mann-Whitney U test was used to assess the correlation between the prevalence of opportunistic pathogens and continuous data.

Results

Subjects' oral hygiene habits

There were no significant differences in oral hygiene habits between the dental hygienists and healthcare workers (P = 0.060). The mean number of decayed, missing, and filled

Teeth (DMFT) was 9.9 ± 6.6 and 12.1 ± 4.0, respectively, which was not significantly different ($P = 0.919$). None of the subjects had taken antibiotics within 1 week of the sampling. Three healthcare workers used mouthwash for oral care, and six of them smoked, whereas none of the dental hygienists did either. Most of the dental hygienists used dentifrice containing fluoride three times a day, and one used it twice a day. Among the dental hygienists, all used dental floss or an interdental brush at least once a week, while eight healthcare workers used dental floss or an interdental brush weekly, and one used dental floss once a month.

Prevalence of opportunistic pathogens

As shown in Table 2, opportunistic pathogens were isolated from 10 (66.7%) of the 15 of the healthcare worker subjects, whereas none were isolated from the dental hygienists. Specific species isolated were *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, and S. marcescens*, which are often detected in the elderly, in long-term hospitalized patients, and in immunologically compromised patients. *S. aureus* was MSSA in 1 subject and MRSA in 1 subject. Two species of *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella oxytoca*, were also detected. However, no obvious clinically relevant manifestations of candidal or MRSA infections were found.

Table 2. Prevalence of opportunistic pathogens in dental plaque

	Dental hygienists ($n = 15$)	Healthcare workers ($n = 15$)
MRSA	0	1
MSSA	0	1
Pseudomonas aeruginosa	0	1
Serratia marcescens	0	1
Alacaligenes sp.	0	1
Staphylococcus sp.	0	1
Candida albicans	0	2
Haemophilus parainfluenzae	0	1
Enterococcus faecalis	0	1
Klebsiella oxytoca	0	1

Each species was isolated from a single subject, except for *Candida albicans*, which was isolated from two subjects
MRSA, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus* aureus

Isolation of cariogenic bacteria

Table 3 shows the amounts of cariogenic bacteria isolated from saliva, expressed as $\log_{10}$ transformed colony-forming units (CFU) per ml of saliva. Total amounts of streptococci and *Lactobacillus* sp. from the healthcare workers were higher than those from the dental hygienists, and the differences were significant. In addition, the amount of *S. mutans* was higher in healthcare workers than in dental hygienists, although the difference was not significant. There were no significant differences in the proportion of *S. mutans* in total streptococci between the dental hygienists and the healthcare workers (data not shown).

Table 3. Amounts of cariogenic bacteria in 5-min stimulated whole saliva samples

	Dental hygienists	Healthcare workers	*P* Value
Lactobacillus sp.	0.63 ± 1.31	2.41 ± 2.14	0.009
S. mutans	2.31 ± 1.75	3.36 ± 1.54	0.108
Total streptococci	5.89 ± 0.32	6.33 ± 0.54	0.032

Values are expressed as $\log_{10}$ transformed colony-forming units per ml of saliva

Table 4. Correlation of oral hygiene habits and prevalence of opportunistic bacteria

	Opportunistic bacteria				
	Not detected		Detected		
	n	Percentage	*n*	Percentage	*P* value
Toothbrushing					
Twice a day	4	0.13	6	0.20	0.045
Three times a day	16	0.53	4	0.13	
Dental floss usage					
Yes	16	0.53	4	0.13	0.045
No	4	0.13	6	0.20	
Interdental brush usage					
Yes	13	0.43	8	0.27	0.675
No	7	0.23	2	0.07	
Floss or Interdental brush					
Yes	18	0.60	5	0.17	0.026
No	2	0.07	5	0.17	
Mouthwash					
Yes	2	0.07	1	0.03	0.965
No	17	0.59	9	0.31	
Smoking					
Yes	18	0.60	6	0.20	0.141
No	2	0.07	4	0.13	

P values were calculated by a two-tailed Fisher's exact test

Correlation of oral hygiene habits and prevalence of opportunistic bacteria

Table 4 data show a comparison of subjects who had opportunistic pathogens with those who did not. We found that oral hygiene habits i.e., the frequency of daily oral care and dental floss usage, had significant correlations with the prevalence of opportunistic pathogens; however, mouthwash usage and smoking had no significant effect. Furthermore, when comparing these factors with the amount of cariogenic bacteria, we only found a significant correlation between the amount of *Lactobacillus* sp. and daily frequency of oral care, whereas no significant difference was seen between the amount of *S. mutans* and DMFT (data not shown).

Discussion

Opportunistic pathogens are known to cause clinical manifestations such as oral candidiasis, fever, and pneumonia in immunologically compromised or elderly subjects. Many studies have reported that *C. albicans*,[13–15] MRSA,[16–18] *P. aeruginosa*,[19] and *S. marcescens*[20] were very frequently isolated from hospital employees and patients, with hands especially noteworthy as areas where these pathogens were found.[21,22] Furthermore, it has been suggested that hospital employees contribute to the dissemination of these pathogens within institutions.[14] Some reports have also shown that these pathogens could be isolated from the oral cavity;[7,23] however, these reports only studied immunologically compromised patients,[6] patients with severe periodontal diseases,[23,24] patients with cystic fibrosis,[25] institutionalized elderly patients,[4,7] and patients with reduced salivation.[26] A few reports have noted that these pathogens were isolated from healthy subjects,[27–29] although the proportions were very low.

Some studies have found that good oral hygiene habits reduce the oral microflora, and that the use of an antibiotic mouthwash or dentifrice can sometimes reduce the prevalence of bacteria.[30] However, in the present study, although two of the healthcare workers used mouthwash for oral hygiene, mouthwash usage was not correlated with the prevalence of opportunistic pathogens, possibly because the biofilm had not been eliminated from the tooth surfaces. Dental plaque is a kind of biofilm on the tooth surface that is composed of glucans and resists the penetration of antibiotics;[31] it is also known to be a reservoir for cross-infection by opportunistic pathogens in saliva, as well as those on the surface of the tongue and pharynx.[32]

When comparing the prevalence of opportunistic pathogens and oral hygiene habits, we found significant differences in prevalence in relation to the frequency of toothbrushing and dental floss usage. In another recent study, we noted that, after oral biofilm was removed by a physical treatment known as professional mechanical tooth cleaning (PMTC), *Haemophilus* sp., *Enterobacter* sp., and *Candida* sp. were eliminated from plaque samples taken from tooth surfaces following the use of a dental drug delivery system (3DS) with 10% povidone iodine gel.[8] While some studies have shown that the prevalence of the opportunistic pathogens in plaque is correlated with the amounts of *Lactobacillus* sp. and *S. mutans* in saliva, others have found that *Lactobacillus* sp. in saliva could be reduced by toothbrushing[33] and dental floss usage.[34] Thus, the results of the present study confirmed the importance of biofilm removal from tooth surfaces. Therefore, we can also stress the importance of oral hygiene measures for reducing the number of opportunistic pathogens in the oral cavities of health workers. Moreover, professional oral care may further diminish the numbers of such pathogens.

References

1. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol 1982;53:223–30.
2. Hodson JJ, Craig GT. The incidence of *Candida albicans* in the plaques of teeth of children. Dent Pract Dent Rec 1972;22:296–301.
3. Nakamura T, Yamazaki N, Taniguchi H, Fujimura S. Production, purification, and properties of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* isolated from saliva. Infect Immun 1983;39:609–14.
4. Russell SL, Boylan RJ, Kaslick RS, Scannapieco FA, Katz RV. Respiratory pathogen colonization of the dental plaque of institutionalized elders. Spec Care Dentist 1999;19:128–34.
5. Sutter VL, Hurst V, Landucci AO. Pseudomonads in human saliva. J Dent Res 1966;45:1800–3.
6. Wahlin YB, Granstrom S, Persson S, Sjostrom M. Multivariate study of enterobacteria and Pseudomonas in saliva of patients with acute leukemia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991;72:300–8.
7. Kuc IM, Samaranayake LP, van Heyst EN. Oral health and microflora in an institutionalised elderly population in Canada. Int Dent J 1999;49:33–40.
8. Nomura Y, Senpuku H, Tsuge S, Hayashi M, Sasaki A, Tamura H, et al. Controlling opportunistic pathogens in the oral cavity of pre-school children by the use of 3DS. Jpn J Infect Dis 2001;199–200.
9. Sconyers JR, Crawford JJ, Moriarty JD. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. J Am Dent Assoc 1973;87:616–22.
10. Hanada N, Nomura Y, Takeuchi H, Senpuku H, Ida H, Yoshikawa E, Kumagai T. New dental drug delivery system for removing mutans streptococci. J Dent Res 2001;80:567.
11. Pitten FA, Panzig B, Schroder G, Tietze K, Kramer A. Transmission of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain at a German University Hospital. J Hosp Infect 2001;47:s125–30.
12. Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MR, Holt JG, Krieg NR, Moulder JW, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1–vol 4. 1989.
13. Rosenberg GM, Kitay M. A comparison of carrier rates of Candida organisms in the oral cavity and under fingernails. Diastema 1977;5:32–4.
14. Hunter PR, Harrison GA, Fraser CA. Cross-infection and diversity of *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff on an intensive care unit. J Med Vet Mycol 1990:28:317–25.
15. Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. J Clin Microbiol 1994;32:2299–300.
16. Muder RR, Brennen C, Goetz AM. Infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees. Infect Control Hosp Epidemiol 1993;14:576–8.
17. Opal SM, Mayer KH, Stenberg MJ, Blazek JE, Mikolich DJ, Dickensheets DL, et al. Frequent acquisition of multiple strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by healthcare

workers in an endemic hospital environment. Infect Control Hosp Epidemiol 1990;11:479–85.
18. Nishijima S, Sugimachi T, Higashida T, Asada Y, Okuda K, Murata K. An epidemiological study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from medical staff, inpatients, and hospital environment in one ward at our hospital. J Dermatol 1992;19:356–61.
19. Srivastava L, Shriniwas, Talwar JR. Carriage of *Pseudomonas aeruginosa* amongst hospital staff and surgical patients on admission. Indian J Med Res 1975;63:196–200.
20. van Ogtrop ML, van Zoeren-Grobben D, Verbakel-Salomons EM, van Boven CP. *Serratia marcescens* infections in neonatal departments: description of an outbreak and review of the literature. J Hosp Infect 1997;36:95–103.
21. Burnie JP, Odds FC, Lee W, Webster C, Williams JD. Outbreak of systemic *Candida albicans* in intensive care unit caused by cross infection. BMJ (Clin Res Ed) 1985;290:746–8.
22. Guilhermetti M, Hernandes SE, Fukushigue Y, Garcia LB, Cardoso CL. Effectiveness of hand-cleansing agents for removing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from contaminated hands. Infect Control Hosp Epidemiol 2001;22:105–8.
23. Scannapieco FA, Mylotte JM. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. J Periodontol 1996;67:1114–22.
24. McCrary BR, Streckfuss JL, Keene HJ. Oral hygiene and the prevalence of oral group D streptococci in medically-physically compromised and periodontal disease patients. J Periodontol 1989;60:255–8.
25. Lindemann RA, Newman MG, Kaufman AK, Le TV. Oral colonization and susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* oral isolates from cystic fibrosis patients. J Dent Res 1985;64:54–7.
26. Almstahl A, Wikstrom M. Oral microflora in subjects with reduced salivary secretion. J Dent Res 1999;78:1410–6.
27. Gold OG, Jordan HV, van Houte J. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. Arch Oral Biol 1975;20:473–7.
28. Holm AK. Oral health in 4-year-old Swedish children. Community Dent Oral Epidemiol 1975;3:25–33.
29. Dmochowska H, Buluk H. Incidence of Candida fungi in the oral cavity in urban and rural school children. Czas Stomatol 1971; 24:859–64.
30. Michishige F, Yoshinaga S, Harada E, Hirota K, Miyake Y, Matsuo T, et al. Relationships between activity of daily living, and oral cavity care and the number of oral cavity microorganisms in patients with cerebrovascular diseases. J Med Invest 1999;46:79–85.
31. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318–22.
32. Salam MA, Senpuku H, Nomura Y, Matin K, Miyazaki H, Hanada N. Isolation of opportunistic pathogens in dental plaque, saliva and tonsil samples from elderly. Jpn J Infect Dis 2001;193–5.
33. Wikner S. Short term effect of mechanical plaque control on salivary concentration of *S. mutans* and lactobacilli. Scand J Dent Res 1986;94:320–6.
34. Newbrun E, Heiblum R, Mayeda A. Effect of flossing, with and without iodine, on human interproximal plaque flora. Caries Res 1980;14:75–83.

GER:ZGERO966XX.90 / 24.12.2002 / FIAM / 2039 / 11: 6

Note: Underlining of [1], figs. 2 and tabs. 5 will be deleted during pagination

All rights reserved.
No part of this publication may be translated into other languages, reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, microcopying, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

© Copyright 2003 by S. Karger AG, Basel, Switzerland

Approx. printed pages:

Running title:
Systemic Diseases in Association with Microbial Species in Oral Biofilm

Clinical Section

Gerontology
DOI: 10.1159/0000XXXXX

Systemic Diseases in Association with Microbial Species in Oral Biofilm from Elderly Requiring Care

H. Senpuku[a] A. Sogame[b] E. Inoshita[c] Y. Tsuha[d] H. Miyazaki[e] N. Hanada[a]

Departments of Bacteriology, National Institute of Infectious Disease, [a]Tokyo, [b]Fukuoka and [c]Hikone, [d]Biomedical Laboratory, Tokyo and [e]Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan

Received: February 14, 2002
Accepted: November 19, 2002

KARGER
Fax + 41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel

0304–324X/. . / . . . . – $19.50/0
Accessible online at:
www.karger.com/ger

Hidenobu Senpuku
Department of Oral Science
National Institute of Infectious Disease
1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162 (Japan)
Tel. +81 3 5285 1111, Fax +81 3 5285 1172, E-mail hsenpuku@nih.go.jp

Key Words
Biofilm bacteria · Systemic disease · *Candida albicans* · *Pseudomonas* spp.

Abstract
Background: The oral cavity is a reservoir for colonization and infection of systemic organs by pathogenic bacteria. It is understood that aging, tooth eruption, hormonal changes, active disease, oral hygiene, and others have an influence on biofilm formation and bacterial accumulation in the oral cavity. ***Objective:*** To understand the influence of systemic health care on microfloral changes, we conducted epidemiological studies of nursing home residents in an attempt to elucidate the relationship between underlying systemic diseases and the isolation frequency of oral opportunistic pathogens. ***Methods:*** The prevalence of bacteria and fungi causing pneumonia in association with oral biofilm bacteria were determined using detection culture plates. The influences of gender, age, denture-wearing status, number of teeth, and bedridden status in the patients residing in nursing homes were then analyzed. ***Results:*** The isolation frequency rates of *Candida albicans*, Pseudomonadaceae, *Staphylococcus* spp., and some strains of Enterobacteriaceae in plaque samples, as well as *C. albicans* and *Xanthomonas maltophilia* in samples from the pharynx, were significantly higher in those requiring systemic care (mean age 83.9 years) than in those who did not require such care (mean 71.0 years). In particular, the frequencies of *Pseudomonas* spp., *C. albicans*, and *Serratia marcescens* in plaque were significantly higher in those who were bedridden. Furthermore, the isolation of *Pseudomonas* spp. and *Klebsiella pneumoniae*, and/or *C. albicans* in plaque was significantly associated with heart disease. ***Conclusion:*** The coexistence of *Pseudomonas* spp. and *C. albicans* in elderly with 10–19 teeth is a potential indicator of high risk for pneumonia and heart disease. Therefore, attention to oral hygiene and professional care for removing the indicators may diminish the occurrence of systemic disease in elderly requiring systemic care.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

3

Introduction

In Japan, the average age is increasing rapidly while the birth rate is decreasing, and elderly people will account for approximately 25% of the population by 2025. Accordingly, the number of bedridden elderly requiring systemic care in residential and nursing homes is also increasing. In the UK, some investigators have reported that institutionalized elderly have worse oral health than those who live independently at home [1, 2]. Moreover, changes in microflora that are related to poor oral health include an increase in the prevalence of some bacteria and may also contribute to the development of pneumonia [3], as aspiration of bacteria present in oropharyngeal flora into the respiratory tract is a risk factor in elderly and compromised hosts [4], and the oral cavity is a reservoir for pathogenic bacteria recolonization that may infect systemic organs.

Oral biofilm is produced by the sequential attachment of a number of bacteria, and is dependent on both species and surface composition [5–10]. These attaching bacteria are able to accumulate on the surface [10]. However, biofilm is known to evade antimicrobial challenges involving antibiotics or host immune defenses by multiple mechanisms [11–14], and it has been shown that antimicrobial agents fail by not being able to fully penetrate it [11]. Furthermore, the bacterial community may increase in the oral environment, presenting considerable hygiene and host defense problems in elderly people [15].

In the present study, the isolation frequencies of opportunistic pathogens from biofilm on tooth surfaces and in the pharynx were examined in the elderly requiring care. We recorded data on the prevalence of bacteria and fungi causing pneumonia in association with oral biofilm bacteria in order to determine the influence of various factors such as gender, age, denture-wearing status, number of teeth, and bedridden status in patients residing in nursing homes. Associations between opportunistic pathogens and systemic disease were also analyzed in these nursing care patients. Our results provide information on microbial frequency in oral biofilm and show the necessity of maintaining good oral hygiene during systemic health care for the elderly in residential and nursing homes.

4

Subjects and Methods

The study population was composed of 329 elderly (age 83.9 ± 7.5 years, 67 males and 262 females) requiring systemic care who resided in 5 different nursing homes in Fukuoka, Japan. They were placed into 4 categories: not bedridden, able to support themselves; slightly bedridden, confined to their bed to some degree; moderately bedridden, confined to their bed for a long time, and completely bedridden, unable to stand or sit. The subjects were compared to 464 controls whit lived independently in their own homes and were self-supporting, to determine risk factors. Both groups were compared for number, age, and sex ratio, and the results are shown in table 1.

To analyze the relationships between plaque microbial count and number of remaining teeth, we divided all subjects into 4 subgroups: those with 0, 1–9, 10–19, or 20 or more teeth in the oral cavity. This grouping by number of teeth has been referred to in previous reports [16, 17]. The typical number of teeth in 80-year-old people in Japan is from 6 to 9. Therefore, the cutoff points at <1, <10 and <20 teeth were used for the grouping.

Clinical information regarding underlying diseases was obtained from a physician's diagnosis or discharge summary. The main underlying diseases in the subjects requiring care were: cerebrovascular disease (n = 165, 50.2%); hypertension (n = 132, 40.1%); heart disease (n = 64, 19.5%); diabetes (n = 30, 9.1%); hepatic disease (n = 4, 1.2%); kidney disease (n = 5, 1.5%); Parkinson's disease (n = 12, 3.6%); orthopedic diseases (n = 44, 13.3%); rheumatism (n = 9, 2.7%), and malignant tumors (n = 10, 3.0%). These diseases were considered to be reliable indicators of systemic problems in the elderly patients. Informed consent was obtained from all subjects prior to the study and ethical clearance was obtained from the Ethics Committee of the Faculty of Dentistry, Niigata University.

Collection of Dental Plaque Samples

Supragingival plaque samples were collected from the posteroanterior buccal surface of the upper right second premolar and first molar using a cotton swab (Seedswab No. 1, Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo), and then transferred to 1 ml of reduced transport fluid (0.4% agar, 0.15% thioglycollate/phosphate-buffered saline) in sterile bottles on ice. For edentulous subjects who used complete dentures, samples were collected from the same regions of the upper right second premolar and first molar of the complete denture. For edentulous subjects not using complete dentures, samples were collected from the residual ridge. Subjects not having any of the above-mentioned teeth provided samples from the opposite side or other remaining teeth.

Collection of Pharynx Samples

Samples were collected from the pharynx using a cotton swab (Seedswab No. 1), then transferred into 1 ml of reduced transport fluid in sterile bottles on ice.

Identification of Bacteria and Fungi

The plaque and pharynx samples were taken in transport fluid to the Biomedical Laboratory (Tokyo, Japan), where the isolation frequencies of bacteria and fungi in each were identified using a culture procedure [18]. The samples were poured directly onto chocolate agar, blood agar, OPA staphylococcus, and drigalski agar plates (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd., Tokyo, Japan). The plates were incubated in an atmosphere of 5% CO_2 at 37°C for 24–48 h. Representative microbial colonies from each plate were gram-stained and isolated by identification using their characteristic appearance, hemolytic, catalytic reaction, and oxidase reactions [19]. Bacteria and fungi known to be responsible for pneumonia were chosen for study and are listed in table 2. These colonies were suspended in 1 ml of 0.5% saline, then gently shaken and tested in microbial detection kits [18].

Statistical Procedures

Data for those subjects requiring and not requiring care were compared by a χ^2 test for equal and unequal variations. p values of <0.05 were considered significant.

Results

Isolation Frequency of Bacteria from Dental Plaque and Pharynx Samples

The isolation frequencies of microbial pathogens from dental plaque and pharynx samples from the patient and control groups are shown in table 3. *Candida albicans, Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas* spp. from dental plaque samples were significantly higher in subjects requiring care than in control subjects: 133/329 (40%) vs. 135/464 (30%), $p < 0.05$; 53/329 (16%) vs. 26/464 (6%), $p < 0.01$; 41/291 (14%) vs. 27/464 (6%), $p < 0.01$, respectively. In the pharynx samples, *C. albicans* and *Klebsiella pneumoniae* were isolated significantly more often in those requiring care: 83/215 (39%) vs. 101/453 (27%), $p < 0.05$, and 35/215 (16%) vs. 40/453 (9%), $p < 0.01$, respectively. In contrast, *Acinetobacter calcoaceticus* from dental plaque samples and *Pseudomonas* spp. from pharynx samples had significantly lower frequencies in the elderly requiring care: 8/329 (2%) vs. 41/464 (0%), $p < 0.01$, and 7/253 (3%) vs. 35/464 (8%), $p < 0.01$, respectively. There were no significant differences in the isolation frequency of coagulase-negative staphylococci, *Serratia marcescens* and *Candida parapsilosis* found in dental plaque or pharynx samples between the 2 groups. The other microbial strains were isolated less frequently (<1%) in dental plaque and pharynx samples from both groups. To evaluate the correlation between bedridden status and microbial isolation in dental plaque samples (table 4), the patient group was divided into 4 subgroups based on bedridden status and the isolation frequencies were calculated. *Pseudomonas* spp. was significantly more often isolated ($p < 0.01$, vs. not) from 16 (16%) of 98 slightly bedridden subjects and 15 (■■%) of 116 moderately bedridden subjects. *C. albicans* and *S. marcescens* were also isolated ($p < 0.05$, vs. not) from 38 (50%) and 7 (9%) of 76, respectively, completely bedridden subjects. Slightly bedridden status was found to significantly decrease the frequency of isolation of *C. parapsilosis* and *E. cloacae*. There was no significant correlation between bedridden status and the other strains.

Correlations between Systemic Disease and Microbial Carriage in Oral Samples

A comparison of the frequency between isolated (*C. albicans* or *K. pneumoniae*) and not isolated dental plaque samples from those requiring care showed heart disease as the only significantly correlated underlying condition (36/151 (23.8%) and 23/175 (12.6%), $p < 0.05$), while hypertension was the only significantly correlated underlying condition related to samples from the pharynx (54/103 (52%) and 41/114 (36%), $p < 0.01$).

We next compared heart disease and the isolation of *C. albicans* and *Pseudomonas* spp. in dental plaque samples. The frequency of *C. albicans* or *Pseudomonas* spp. was significantly higher in elderly subjects with heart disease than in the control subjects (37/164 (22.6%) vs. 22/162 (13.4%), $p < 0.05$). There were no significant differences in the incidence of other diseases between infected and control group samples.

Associations between various parameters (oral status, denture and oral cleaning, and isolation of bacteria and fungus in plaque) and tooth number in the elderly subjects requiring systemic care were also analyzed (table 5). Complete dentures were used in 98 (56%) of the 165 edentulous subjects, and complete or partial dentures were used in 37 (37%) and 35 (35%), respectively, of 99 elderly subjects with 1–9 teeth, in whom periodontitis was found in 60% and gingivitis in 16%. The incidence of periodontitis in elderly subjects with 10–19 teeth (73%) was significantly higher than in those with 20 or more (45%). In contrast, the incidence of gingivitis in subjects with 10–19 teeth (24%) was significantly lower than in those with 20 or more (55%). Oral hygiene (denture and oral cleaning) tended to worsen as the number of teeth increased in elderly requiring systemic care.

An analysis of the relationship between plaque microbial count and the number of remaining teeth revealed that *C. albicans, Pseudomonas* spp., and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* were detected more frequently in subjects with 20 or more teeth than in edentulous subjects (table 4). In general, denture-wearing habits had an influence on the prevalence of *C. albicans* in the oral cavity. In the present study, *C. albicans* was also detected more frequently in edentulous subjects with complete dentures (46%) than without (21%). Therefore, the prevalence of *C. albicans* was influenced by the usage of complete dentures in edentulous subjects.

We also analyzed the relationship between the number of teeth and the prevalence of systemic disease. *Pseudomonas* spp.-positive elderly people with 10–19 teeth had heart disease significantly more frequently (approximately 71%) than those with 0 teeth (13%, $p = 0.006$) or 1–9 teeth (25%, $p = 0.046$), as shown in figure 1. There were no significant differences in the incidence of other diseases between infected and noninfected group samples. Further, the incidence of heart disease in those with 20 or more teeth was lower than in those with 10–19 teeth (fig. 1). Subjects with 10–19 teeth and accumulations of both *Pseudomonas* spp. and *C. albicans* in plaque also showed a significant risk for heart disease (fig. 2). Subjects with 20 or more teeth and accumulation of *Pseudomonas* spp. and *C. albicans* in plaque, however, did not show a significant risk for heart disease (fig. 1, 2).

Discussion

The isolation frequencies of *C. albicans*, some Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, and *S. aureus* (methicillin-susceptible and methicillin-resistant) in plaque samples, and *C. albicans* and *Xanthomonas maltophilia* in pharynx samples were significantly higher in the elderly requiring care (table 3). An increased prevalence of these bacteria was associated with the requirement for care, since the elderly in nursing homes cannot care for themselves and as a result generally have poor oral conditions [3]. Previous studies have suggested that the oral carriage of bacteria causing pneumonia such as *K. pneumoniae, Pseudomonas* spp., and *Staphylococcus* spp. is low in healthy subjects, and higher in immunodeficient and myelo-suppressed subjects [20–22] and also in patients with severe periodontal disease [23, 24]. The significantly higher prevalence of these bacteria in the elderly requiring care is of interest, as they may be at greater risk of developing systemic disease such as pneumonia and heart disease. The proportion of those who were bedridden and with one underlying medical condition accounted for 89% of all the elderly subjects in nursing homes (table 1). It is possible that individuals who are completely bedridden tend to suffer a deterioration of host defense and poor oral hygiene. Our results also demonstrated that the frequency of *C. albicans, Pseudomonas* spp., and *S. marcescens* was significantly higher in bedridden than control subjects (table 4). Therefore, it is suggested that the bedridden condition encourages infection or accumulation of *C. albicans, Pseudomonas* spp., and *S. marcescens* in plaque and, thus, is a risk factor for respiratory tract infection by aspiration. Bedridden subjects were also found to be subject to a progressive loss of protective reflexes, which is also a factor with aspiration pneumonia in the elderly [25].

C. albicans, Pseudomonas spp., and methicillin-susceptible *S. aureus* were detected more frequently in subjects with 20 or more teeth than in edentulous subjects (table 5). Care of the oral cavity is difficult for elderly people with many teeth, and it is more difficult for a care provider to clean teeth in a patient than to clean removable dentures. Edentulous elderly people and those with 1–9 teeth often use total or partial dentures, making it easier for the care provider to assist with oral hygiene. This was supported by our results and probably explains why the pathogenic microorganism detection rate increased with the number of teeth in the oral cavity (table 5). We also found that *C. albicans*- and *Pseudomonas* spp.-positive elderly people with 10–19 teeth had heart disease significantly more frequently than those with 0 or 1–9 teeth, as shown in figures 1 and 2. However, the incidence of heart disease in those with 20 or more teeth was lower than in those with 10–19 teeth. It also seems possible that pathogenic bacteria can invade the body via inflamed gingiva in people with relatively many remaining teeth and periodontitis. In edentulous people, heart disease is less likely to develop because there is no route of body invasion for bacteria responsible for heart disease via the oral cavity. In addition, it has been reported that *Porphyromonas gingivalis*, a putative pathogenic microorganism associated with periodontal diseases, may be involved in the pathogenesis of coronary heart disease [26, 27] and that *Pseudomonas* spp. was detected around the gingiva of patients with periodontal diseases [23].

Our results demonstrate a mildly significant association of multiple biofilm formation by *Pseudomonas* spp. and *K. pneumoniae*, and/or *C. albicans* with heart disease. However, these findings were limited to elderly requiring systemic care and with poor oral hygiene, because there were few numbers of systemic disease patients in control subjects. Further, this connection may well have been a result of more than one cross-correlation with other pathogens that induce heart disease. During the development of biofilm on the teeth, pathogenic strains are incorporated into the biofilm in association with oral bacteria. Together, they are likely to be key species for biofilm formation that infect various body sites, such as the heart through the blood stream or the lower respiratory tract during aspiration.

Dental plaque is defined as a diverse microbial community found on the tooth surface, which is embedded with a matrix of polymers of bacterial and salivary origins [28]. In the elderly requiring care, biochemical gradients develop that enable the coexistence of a number of species including opportunistic organisms that form a bacterial community during the process of colonization. Opportunistic organisms are those that rarely if ever lead to disease in immunocompetent people, however, they can cause serious disease in older people with underlying systemic problems. To identify these high-risk individuals,

the surveillance of potential indicators such as *Pseudomonas* spp. and *K. pneumoniae* that induce harmful oral biofilm may be a necessary health care procedure for elderly adults requiring systemic care. Furthermore, such biofilm should be removed through improved methods of oral hygiene, the use of chemical agents, and by access to a professional such as a dental hygienist. Some studies have found that good oral hygiene habits and professional care can reduce the number of oral cavity microorganisms, and that use of an antimicrobial agent and physical cleaning for removal of oral biofilm can reduce the prevalence of bacteria [29, 30]. From the present results, we suggest that the first step should be to remove the dental biofilm, thus disrupting microbial adhesion and biofilm formation, otherwise chemotherapeutic and antimicrobial agents will not be able to function effectively.

Infection and colonization of *Pseudomonas* spp., *K. pneumoniae*, and *C. albicans* on the tooth surfaces of elderly people who require care can serve as indicators of the accumulation of various microorganisms as well as risk factors for the development of systemic diseases, such as heart disease. Recently, Yoneyama et al. [31] suggested that oral care might be useful in preventing pneumonia in older patients in nursing homes. Therefore, attention to oral hygiene including professional care may diminish the risk of systemic disease. In addition, identification of high-risk patients, education of staff in nursing homes, hand washing, and the use of disposable gloves are also proposed to help diminish the risk. Taken together, such procedures may be beneficial for the continued health of elderly people.

Acknowledgments

We thank Dr. Matin Khairul for the critical reading of the manuscript. This work was supported in part by a grant from the Japan Health Science Foundation to N.H. This work was supported in part by Grants-in-Aid for Developmental Scientific Research (20250186 and 12557158 to H.S.) from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan.

References

1 Steele JG, Sheiham A, Marcenes W, Walls AWG: National Diet and Nutrition Survey: People Aged 65 Years and Over. Vol 2: Report of the Oral Health Survey. London, Stationery Office, 1998.

2 Simons D, Kidd EA, Beighton D: Oral health of elderly occupants in residential homes. Lancet 1999;353:1761.
3 Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, Sasaki H: Oral care and pneumonia. Oral Care Working Group. Lancet 1999;354:515.
4 Valenti WM, Trudell RG, Bentley DW: Factors predisposing to oropharyngeal colonization with gram-negative bacilli in the aged. N Engl J Med 1978;298:1108–1111.
5 McEldowney S, Fletcher M: Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. Arch Microbiol 1987;148:57–62.
6 Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J: The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol 1982;53:223–230.
7 Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986;50: 353–380.
8 Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR: Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. Infect Immun 1983;42:510–515.
9 Bowden GH: Microbiology of root surface caries in humans. J Dent Res 1990;69:1205–1210.
10 Gibbons RJ: Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: A contribution of oral microbiology. J Dent Res 1996;75:866–870.
11 Costerton JW, Stewart PS, Greeberg EP: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318–1322.
12 Millward TA, Wilson M: The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms. Microbios 1989;58:155–164.
13 Wilson M: Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. J Med Microbiol 1996;44:79–87.
14 Tillotson JR, Finland M: Bacterial colonization and clinical superinfection of the respiratory tract complicating antibiotic treatment of pneumonia. J Infect Dis 1969;119:597–624.
15 Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD: Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. J Med Microbiol 1991;35:5–11.
16 Takata Y, Ansai T, Matsumura K, Awano S, Hamasaki T, Sonoki K, Kusaba A, Akifusa S, Takehara T: Relationship between tooth loss and electrocardiographic abnormalities in octogenarians. J Dent Res 2001;80:1648–1652.
17 Lawrence HP, Garcia RI, Essick GK: Hawkins R, Krall EA, Spiro A 3rd, Vokonas PS, Kong L, King T, Koch GG: A longitudinal study of the association between tooth loss and age-related hearing loss. Spec Care Dentist 2001;21:129–140.
18 Salam MA, Senpuku H, Nomura Y, Matin K, Miyazaki H, Hanada N: Isolation of opportunistic pathogens in dental plaque, saliva and tonsil samples from elderly. J Infect Dis 2001; 54:193–195.
19 Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MR, Holt JG, Krieg NR, Moulder JW: Pfennig N, Sneath PHA, Steley JT, Williams ST: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 1989, vol 1–4.

20 Minah GE, Rednor JL, Peterson DE, Overholster CD, Depaola LG, Suzuki JB: Oral succession of gram-negative bacilli in myelosuppressed cancer patients. J Clin Microbiol 1986; 24:210–213.
21 Bergmann OJ, Kilian M, Ellegaard J: Potentially pathogenic microorganisms in the oral cavity during febrile episodes in immunocompromised patients with haematologic malignancies. Scand J Infect Dis 1989;21:43–51.
22 Costerton JW, Lewandowski Z: Microbiol biofilms. Annu Rev Microbiol 1995;49:711–745.
23 Slots J, Felk D, Rams TE: Prevalence and antimicrobiologic susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1990;5:149–154.
24 Scannapieco FA, Mylotte JM: Relationship between periodontal disease and bacterial pneumonia. J Periodontol 1996;67:1114–1122.
25 Sasaki H, Sekizawa K, Yanai M, Arai H, Yamaya M, Ohrui T: New strategies for aspiration pneumonia. Intern Med 1997;36:851–855.
26 Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A: Invasion of endothelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 2000;187:139–144.
27 Dorn BR, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A: Invasion of hu- coronary artery cells by periodontal pathogens. Infect Immun 1999;67:5792–5798.
28 Marsh PD, Bradshaw DJ: Dental plaque as a biofilm. J Industr Microbiol 1995;15:169–175.
29 Michishige F, Yoshinaga S, Harada E, Hirota K, Miyake Y, Matsuo T, et al: Relationships between activity of daily living, and oral cavity care and the number of oral cavity microorganisms in patients with cerebrovascular diseases. J Med Invest 1999;46:79–85.
30 Nomura Y, Senpuku H, Tsuge S, Hatashi M, Sasaki A, Tamura H, Ida H, Yoshikawa E, Nishikawara F, Kawamura S, Kokubo K, Hanada N: Controlling opportunistic pathogens in the oral cavity of pre-school children by the use of 3DS. J Infect Dis 2001;54:199–200.
31 Yoneyama T, Yoshida M, Ohrui T, Mukaiyama H, Okamoto H, Hoshiba K, Ihara S, Yanagisawa S, Ariumi S, Morita T, Mizuno Y, Ohsawa T, Akagawa Y, Hashimoto K, Sasaki H: Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. J Am Geriatr Soc 2002;50: 430–433.

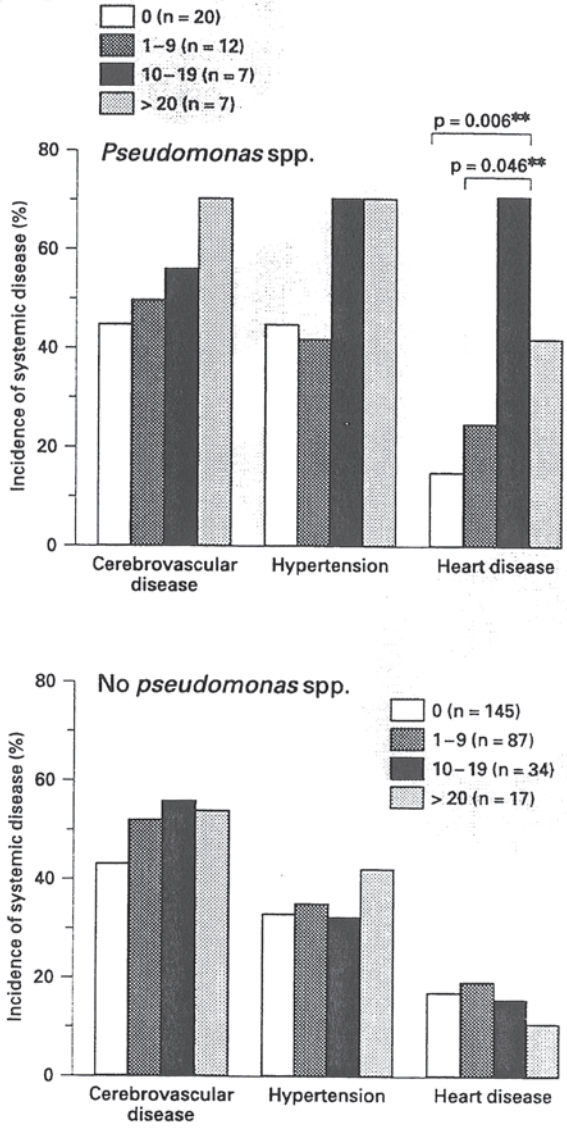


Fig. 1. Relationship between the number of teeth and prevalence of systemic disease in *Pseudomonas* spp.-positive elderly. The incidence of cerebrovascular disease, hypertension, and heart disease between patients with and without *Pseudomonas* spp. in plaque were compared among those with 0, 1–9, 10–19, and >20 teeth using a χ^2 test (0 vs. 1–9, 10–19 or >20, 1–9 vs. 10–19 or >20 teeth, and 10–19 vs. >20 teeth). Significances ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$.

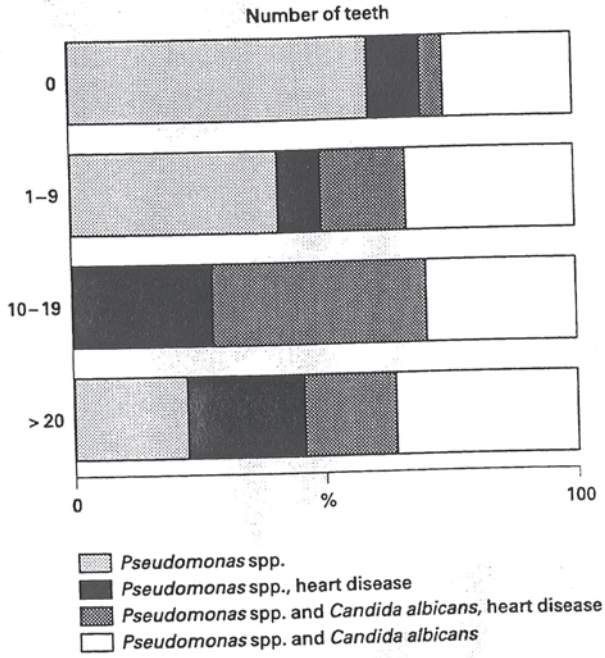


Fig. 2. Relationship between the number of teeth and prevalence of heart disease in *Pseudomonas* spp.- and/or *C. albicans*-positive elderly. Groups infected with *Pseudomonas* spp. alone without and with heart disease, and with *Pseudomonas* spp. and *C. albicans* without and with heart disease were compared to patients with 0, 1–9, 10–19, or >20 teeth.

Table 1. Subjects details

Groups of elderly subjects	n	Age years	Male		Female	
			n	%	n	%
Not requiring care	464	72.0±0.3	247	53	217	47
Requiring care	329	83.9±7.5	61	21	230	79
Bedridden status						
Not	31	81.8±6.6	4	13	27	87
Slightly	98	84.0±6.9	21	22	77	78
Moderately	106	83.3±8.7	20	19	86	81
Completely	76	85.2±8.0	18	24	58	76

Age is given as a mean ± SD. All other data are the number of subjects and percent. Bedridden status is described in detail in Materials and Methods.

Table 2. Bacteria and fungi detected in plaque and pharynx samples

Coagulase-negative staphylococcus
Staphylococcus aureus
(MSSA, MRSA)
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus anginosus
β-Hemolytic streptococcus (type A)
β-Hemolytic streptococcus (type B)
β-Hemolytic streptococcus (type C)
β-Hemolytic streptococcus (type D)
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Citrobacter freundii
Comamonas acidovorans
Enterobacter spp.
Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae
Flavobacterium meningosepticum
Acinetobacter calcoaceticus
Haemophilus influenzae
Haemophilus parainfluenzae
Klebsiella spp.
Klebsiellaoxytoca
Klebsiella pneumoniae
Klebsiella ozaenae
Moraxella catarrhalis
Morganella morganiiProteus mirabilis
Pseudomonas spp.
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas cepacia
Serratia marcescens
Xanthomonasmaltophilia
Bacillus cereus

Candida albicans
Candida glabrata
Candida tropicalis
Candida parapsilosis

MSSA = Methicillin-suseptible *S. aureus*; MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*.

Table 3. Isolation frequencies of bacteria and fungi found in plaque and pharynx samples

Bacteria and fungi	Requiring care		Not requiring care	
	plaque (n = 329)	pharynx (n = 253)	plaque (n = 464)	pharynx (n = 453)
Candida albicans	133 (40%)[a]	83 (39%)[a]	135 (30%)	101 (27%)
Enterobacter cloacae	53 (16%)[b]	27 (11%)	26 (6%)	27 (6%)
Pseudomonas spp.	37 (11%)[b]	7 (3%)[b]	27 (6%)	35 (8%)
Klebsiella pneumoniae	31 (9%)	35 (14%)[b]	32 (7%)	40 (9%)
Xanthomonas maltophilia	26 (8%)[b]	7 (2%)	8 (2%)	17 (4%)
Klebsiella oxytoca	21 (6%)[b]	3 (1%)	6 (1%)	13 (3%)
Staphylococcus aureus (MSSA)	18 (5%)[b]	8 (2%)	8 (2%)	20 (4%)
Coagulase negative staphylococci	17 (5%)	8 (2%)	15 (3%)	7 (2%)
Serratia marcescens	12 (4%)	4 (2%)	5 (1%)	5 (1%)
Pseudomonas aeruginosa	11 (3%)[a]	19 (6%)	4 (<1%)	4 (<1%)
β-Hemolytic streptococcus (type B)	9 (2%)[a]	4 (2%)	2 (<11%)	2 (<1%)
Acinetobacter calcoaceticus	8 (2%)[b]	6 (2%)	41 (9%)	30 (7%)
Candida parapsilosis	8 (2%)	4 (4%)	23 (5%)	17 (4%)
Staphylococcus aureus (MRSA)	8 (2%)[a]	5 (2%)	2 (<1%)	2 (<1%)

MSSA = Methicillin-susceptible *S. aureus*; MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*. All data are number of subjects (percent).

[a] $p < 0.05$ (χ^2 test with continuing correction, plaque and pharynx samples in requiring care vs. not requiring care).

[b] $p < 0.01$ (χ^2 test with continuing correction, plaque and pharynx samples in requiring care vs. not requiring care).

Table 4. Correlation between bacteria and fungi in dental plaque and bedridden status

Bacteria and fungi	Bedridden status			
	not (n = 31)	slightly (n = 98)	moderately (n = 106)	completely (n = 76)
Candida albicans	8 (26%)	38 (39%)	41 (39%)	38 (50%)
Enterobacter cloacae	7 (23%)	8 (8%)[a]	18 (17%)	11 (14%)
Pseudomonas spp.	0 (0%)	16 (16%)[b]	15 (15%)[b]	6 (8%)
Klebsiella pneumoniae	5 (16%)	10 (10%)	4 (4%)	10 (13%)
Xanthomonas maltophilia	5 (16%)	8 (8%)	6 (6%)	2 (3%)
Klebsiella oxytoca	3 (10%)	4 (4%)	5 (5%)	10 (13%)
Staphylococcus aureus (MSSA)	1 (3%)	5 (5%)	2 (2%)	3 (4%)
Coagulase negative staphylococci	2 (6%)	2 (2%)	3 (3%)	6 (8%)
Serratia marcescens	0 (0%)	2 (2%)	1 (1%)	7 (9%)[a]
Pseudomonas aeruginosa	2 (6%)	3 (3%)	3 (3%)	3 (4%)
β-Hemolytic streptococcus (type B)	0 (0%)	1 (1%)	4 (4%)	6 (8%)
Acinetobacter calcoaceticus	0 (0%)	3 (3%)	3 (3%)	2 (3%)
Candida parapsilosis	6 (19%)	3 (3%)[b]	1 (1%)[b]	0 (0%)[b]
Staphylococcus aureus (MRSA)	1 (3%)	1 (1%)	2 (2%)	3 (4%)

MSSA = Methicillin-susceptible *S. aureus*; MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*. All data are number of subjects (percent). Bedridden status is described in detail in Materials and Methods.

[a] $p < 0.05$ (χ^2 test with continuing correction, not vs. slightly, moderately and completely).

[b] $p < 0.01$ (χ^2 test with continuing correction, not vs. slightly, moderately and completely).

Table 5. Association between various parameters and tooth number in elderly requiring systemic care

Parameters	All subjects (n = 329)	Number of teeth			
		0 (n = 165)	1–9 (n = 99)	10–19 (n = 41)	>20 (n = 24)
Age, years (mean ± SD)	83.9±7.5	86.5±6.2	83.1±7.7	78.9±8.8	79.3±8.1
Oral status					
Full denture	–	98 (56%)	37 (37%)	–	–
Partial denture	–	–	35 (35%)	12 (30%)	–
Periodontitis	–	–	60 (60%)	30 (73%)	11 (45%)[c]
Gingivitis	–	–	16 (16%)	10 (24%)	13 (55%)[b, c]
Denture and oral cleaning					
Excellent	–	29 (18%)	14 (14%)	1 (2%)[a, b]	0 (0%)[a, b]
Moderate	–	120 (73%)	36 (36%)[a]	15 (37%)[a]	2 (8%)[a–c]
Poor	–	16 (9%)	49 (49%)[a]	25 (61%)[a]	22 (92%)[a, b]
Bacteria and fungus					
Candida albicans	133 (40%)	59 (36%)	46 (47%)	13 (32%)	15 (63%)[a]
Enterobacter cloacae	53 (16%)	27 (17%)	12 (12%)	8 (20%)	5 (21%)
Pseudomonas spp.	47 (12%)	20 (12%)	12 (12%)	6 (15%)	8 (33%)[a]
Klebsiella pneumoniae	31 (9%)	15 (9%)	8 (8%)	6 (15%)	2 (8%)[b]
Xanthomonas maltophilia	25 (8%)	13 (8%)	5 (5%)	2 (5%)	5 (21%)[b]
Klebsiella oxytoca	21 (6%)	11 (7%)	3 (3%)	4 (10%)	3 (13%)
Staphylococcus aureus (MSSA)	18 (5%)	2 (1%)	9 (9%)	4 (10%)	3 (13%)[a]

[a] $p < 0.05$, χ^2 test. vs. 0.
[b] $p < 0.05$, χ^2 test, vs. 1–9.
[c] $p < 0.05$, χ^2 test, vs. 10–19.

■特集

やってみよう 微生物・生化学検査

①歯科微生物・生化学検査

国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信
国立保健医療科学院口腔保健部　花田信弘

②微生物検査の実態

国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信
日本歯科大学衛生学講座・（株）BML　由川英二

③検査の活かし方

鶴見大学歯学部予防歯科学教室　野村義明
国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信

デンタルハイジーン
第22巻　第6号別刷
2002年6月20日発行

特集

やってみよう 微生物・生化学検査

① 歯科微生物・生化学検査

国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信
国立保健医療科学院口腔保健部　花田信弘

② 微生物検査の実態

国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信
日本歯科大学衛生学講座・（株）BML　由川英二

③ 検査の活かし方

鶴見大学歯学部予防歯科学教室　野村義明
国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信

現在，「齲蝕や歯周病は感染症である」という概念が成立しつつあり，歯科用の微生物・生化学検査の必要性が高まってきています．

細菌の培養やDNAを用いた研究技術の進歩の速さは目を見はるものがあります．それらを歯科医療に活用するために，近年，歯科微生物・生化学検査システムがスタートしました．現在ではその蓄積された実績から，有用性が一段と認識されはじめています．

本特集では，歯科検査の種類，歯科検査にはどんな意味があり何がわかるのか，そして検査結果の活かし方をご紹介します．（泉福英信）

特集（やってみよう歯科微生物・生化学検査）

①歯科微生物・生化学検査

国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信
国立保健医療科学院口腔保健部　花田信弘

歯科微生物検査の意味

医科領域では，患者さんが体に異常を訴えて医師のもとへ訪れると，医師は患者さんから得られるさまざまな情報をもとに疾患の診断をくだします．その情報を得る手段として，問診・視診・打診・触診による所見があり，風邪，腹痛，頭痛のように直接その患部を診ることのできない場合，血液や尿を材料とした臨床検査が行われています．

また，結核菌，赤痢菌，コレラ，インフルエンザなどの感染症は，体内への感染と疾病の発症を直接結びつけやすいため，微生物感染対策が治療の中心となり，さまざまな薬を投与することで対応します．

しかし，歯科領域での齲蝕や歯周病治療の場合は，歯質や歯周組織の状態を直接見るにとどまり，目に見えない口腔内微生物，病原微生物はそのままにされています．また，齲蝕や歯周病は，発症までに多くの時間がかかることも，病原を放置してしまう理由と考えられるでしょう．

細菌の培養やDNAを用いた研究技術の急速な進歩により，口腔病原微生物の検出技術は急速に進歩しています．また，唾液には，洗浄効果，緩衝作用，抗菌作用，損傷治癒効果などさまざまな効能があり，その性状を調べると齲蝕や歯周病の感受性がわかるので，微生物の検出とともに重要な情報となります．

したがって，歯垢，唾液，歯周ポケット内の病原微生物の量，唾液の性状を測定することができれば，齲蝕や歯周病へのかかりやすさがわかり，歯科治療や予防治療の効果判定，治療の終了時期の決定にその情報を利用することができます．すなわち，口腔疾患の診断や治療方針の決定，予防プログラムの構築，治療後の評価など，一歩進んだ幅広い医療を提供することができます（図1）．

加えて，高齢者，障害者，全身性疾患をもつ患者さんへの歯科医療，矯正，外科，再生，インプラントなど最新の歯科医療にも多大なよい影響を与えることが期待されます．

齲蝕に関する微生物検査

1．齲蝕発症のメカニズム

齲蝕が発症する原因は，微生物の感染増殖により歯表面に菌の塊が付着することです．その塊を口腔バイオフィルム（歯垢）とよんでいます（図2）．

齲蝕の原因とされるレンサ球菌（*Streptococcus mutans*，*Streptococcus sobrinus*）や乳酸桿菌（*Lactobacillus spp.*）は，食物残渣を分解

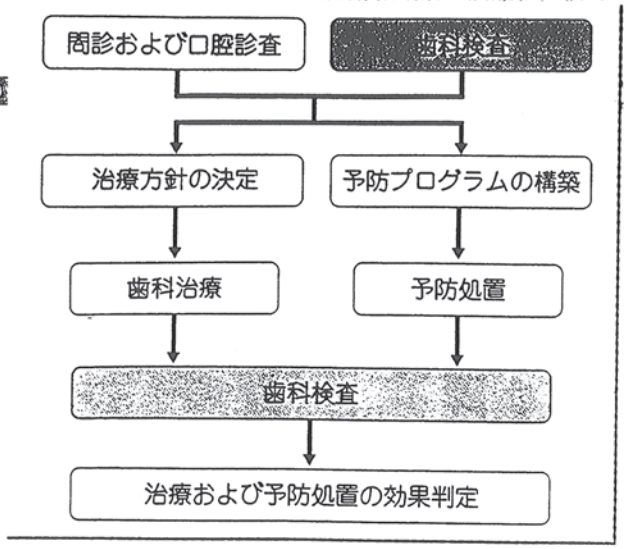


図1　歯科検査を行うタイミング

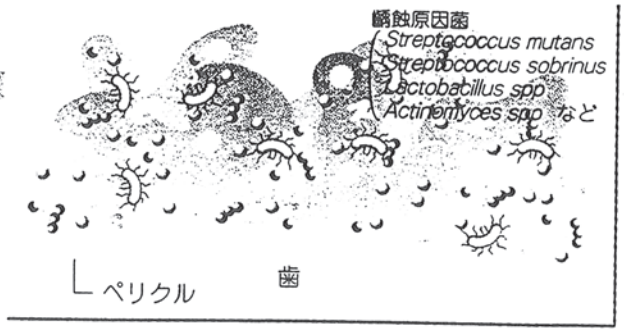


図2　歯表面バイオフィルムの微生物層．齲蝕原因菌を含め，さまざまな微生物による共同体が形成されている

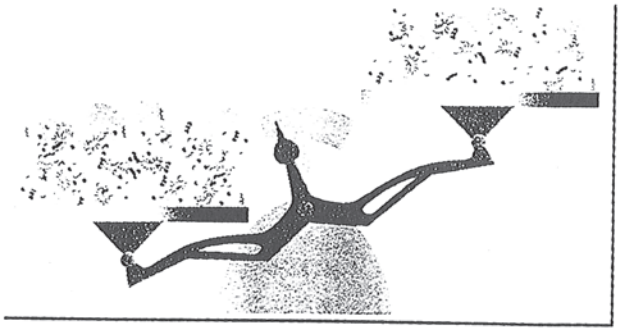


図3　微生物層のバランスの崩れ．微生物層の変化が齲蝕発症へと導いていく

し，歯垢のもととなる微生物代謝産物を作って増殖していきます．微生物は自己が生きるために都合のよい環境を作るために，グリコカリックスと総称される，ねばねばした多糖体を産生します．細菌は多糖体に包まれて分裂・増殖を続けて固層の表面を覆い，それが微生物の膜のように見えることから“バイオフィルム”とよばれるようになりました．

歯表面上では，ミュータンスレンサ球菌が砂糖を分解してねばねばした多糖体（グルカン）を合成し，その多糖体を含む病原性のあるバイオフィルムが形成されます[1)]．

2．微生物検査の目的と種類

病原性の少ない常在菌を含め，口腔には多くの微生物が住み，ある一定のバランスを取りフローラを形成しています．しかし，そのバランスが崩れたときに病原性微生物が異常に増殖し，病気が発症することになります(図3)．

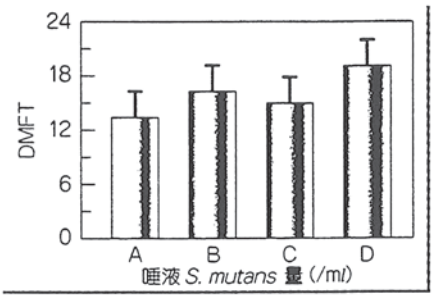
よって，微生物検査を行う意味は，口腔フローラのバランスが崩れたときの病原微生物の棲息状況を把握すること，予知性のある口腔感染症のリスク判定のための情報源を得ることです．

現在できる齲蝕の微生物検査を図6に示します．齲蝕，歯周病，日和見菌に関する検査のなかから必要に応じて検査を選ぶとよいでしょう．簡易キットで行うか外注で行うかは，疾病の程度，治療機会，時間，経済的な側面を考慮に入れて歯科医師の判断によりますが，データの正確さについては，時間をかけて検査を行う分，外注検査のほうがまさっているように感じられます．

簡易キットの利点は，チェアサイドで即座に結果がわかるため，モチベーションにすぐに利用しやすいことなどがあげられます．

3．齲蝕検査の実施例

ある歯科医院で患者54人にカリエス検査（株式会社ビー・エム・エル，以下BML）を行ったところ，唾液中に200,000/mL以上の*S. mutans*が存在する人は，10,000/mL以下の人よりも有意にDMFTが高く，*Lactobacillus spp.*量も多いことが明らかになりました(図4，5)．



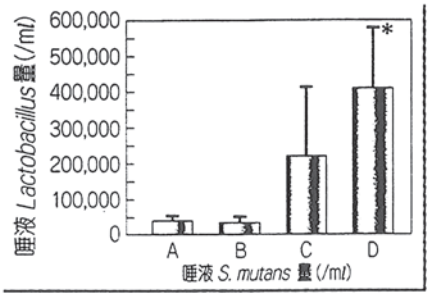


図4　唾液 *S. mutans* 量の変動と DMFT の関係
図5　唾液 *S. mutans* 量の変動と *Lactobacillus* との関係

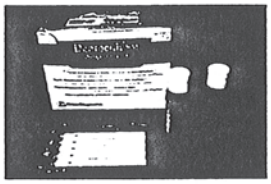
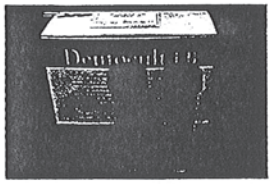
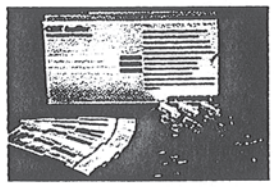
簡易キット		**Dentocult-SM** ミュータンスレンサ球菌の検出 （オーラルケア）
		**Dentocult-LB** 乳酸桿菌の検出 （オーラルケア）
		ミューカウント ミュータンスレンサ球菌の検出 （昭和薬品化工）
		**CRT-バクテリア** ミュータンスレンサ球菌・乳酸桿菌の検出 （白水貿易）
		RD テスト昭和 ミュータンスレンサ球菌・乳酸桿菌の検出 （昭和薬品化工，白水貿易）
外注検査	**カリエス検査**	ミュータンスレンサ球菌・乳酸桿菌，総レンサ球菌の定量（BML）

図6　齲蝕に関する微生物検査

また，唾液に *S. mutans* が多く存在した人は，齲蝕のリスクがより高いことが考えられ，少なくとも 100,000／mL 以上の *S. mutans* を有する人は，除菌のための処置（PMTC＋3DS）などが必要と考えられます[2,3]．

歯周病に関する微生物検査

1．歯周病発症のメカニズム

歯周病が発症する原因は，嫌気性菌（*Porphylomonas gingivalis*，*Actinobacillus actinomycetemcomitans*，*Prevotella intermedia* など）[4] が歯肉縁下にバイオフィルムを形成して歯周組織の破壊にかかわる因子を放出し，またそこから遊離した菌が歯周組織に侵入し，直接病原性を発揮するためではないかと考えられています．

しかし，これらの歯周病菌について，それぞれが病原菌としての根拠を議論されているのが現在の状況です．

試験管を用いた研究，動物実験，臨床研究などさまざまな研究の成果を考えると，その関連性を否定することはできませんが，一方で，特定の菌にしぼって調査を行うと，必ずしも歯周病の病状と相関しないことがあります．

それは，宿主の生活習慣，遺伝的な感受性の

問題，全身疾患の有無などたくさんの因子がかかわっていることが原因かもしれません．

また，特定の菌ではなく非特異的な菌の集団が関与しているケースもあると考えられます．

2．微生物検査の目的と種類

以上のことから，歯周病における微生物検査は1つの情報と考え，後述する唾液を用いた生化学検査，ブラッシング・タバコ・喫煙などの生活習慣，糖尿病・白血病などの全身疾患などのさまざまな情報をもとに治療計画・予防計画を練ることが必要でしょう．

いずれにしても，歯周病の場合，スケーリング，ルートプレーニング，歯周外科処置，ブラッシング指導を行うことが一般的です．これらの処置は，結果的に菌を除去することにつながっているので，確実に病原菌を除去することができているか，その効果判定に微生物検査を利用するのもよいでしょう．

現在利用できる歯周病に関する微生物検査を図7に示します．

今後は，これらの検査を通した情報交換により，さらに有効な利用方法が確立されてくると考えています．

日和見菌に関する微生物検査

1．どんな場合に日和見菌が検出されるか

免疫力の低下を伴う全身疾患をもつ者や高齢者などからは，真菌，腸内細菌，肺炎桿菌，肺炎球菌，黄色ブドウ球菌，緑膿菌，セラチア菌なども検出されます．免疫力がまだ完成されていない幼児から，このような菌が検出されることがあります．

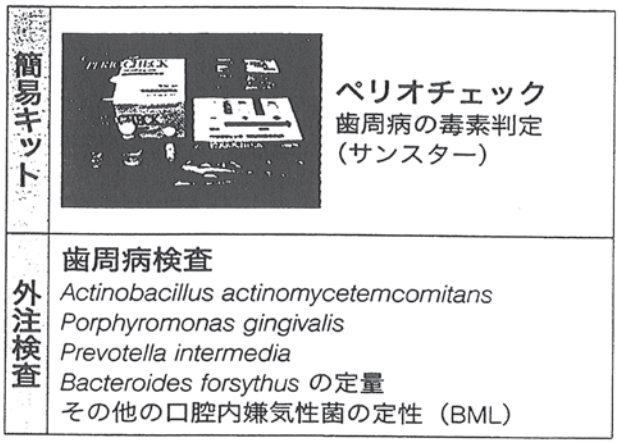


図7　歯周病に関する微生物検査

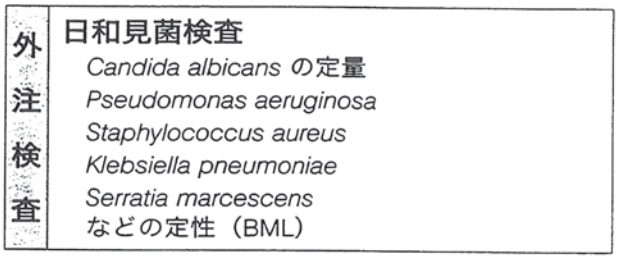


図8　日和見菌に関する微生物検査

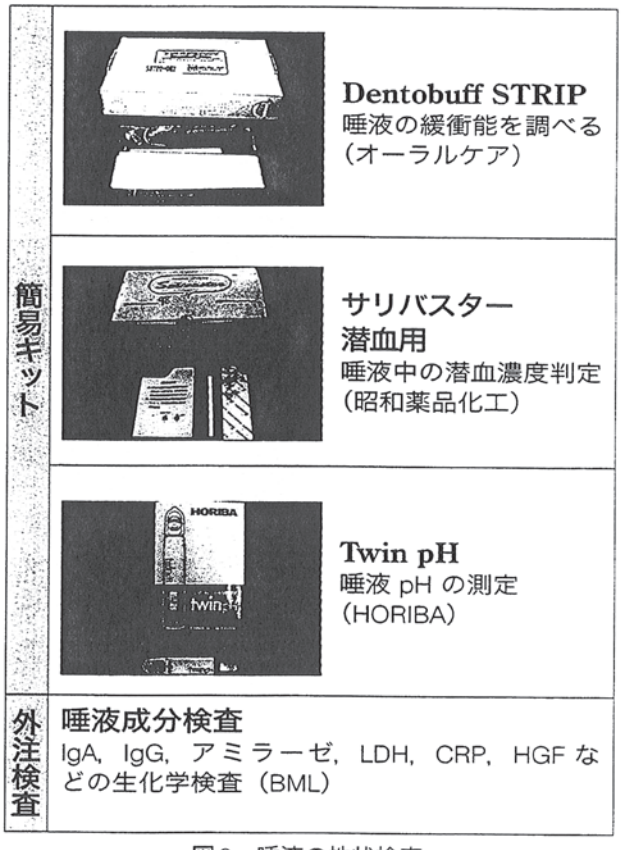


図9　唾液の性状検査
※唾液分泌量検査については，カリエス検査（BML）に含まれている

脳血管疾患を有する要介護高齢者の場合，誤嚥を起こしやすく，このような菌が誤って肺に入ると，嚥下性肺炎を起こす危険性があるとされています．また，菌が血流に入ると，菌血症や動脈硬化や心疾患の原因になるなど，さまざまな研究が報告されています．

2．検査の種類

現在利用できる日和見菌に関する微生物検査のリストを**図8**に示します．おもに外注検査で行われています．

現在は定性分析がメインなのですが，特定の菌に定めた定量分析も研究段階とのことで，近日中に利用できるようです．また，検出菌も現在は好気性菌が中心ですが，嫌気性菌についても研究段階とのことです．

3．日和見菌検査の実施例

私たちがこの検査を利用した結果を簡単に紹介します．

65～105歳までの介護の必要な特別養護老人ホーム入所者329名（平均年齢82歳，男性67名，女性262名）を対象に検査したところ[5]，歯垢中，咽頭粘膜上および舌上に，真菌が高率に検出されました（*Candida albicans*：歯垢中40%，咽頭粘膜上38%，舌上40%）．

また，腸内細菌も高率であり（*Enterobacter cloacae*：歯垢中16%，咽頭粘膜上11%，舌上13%），肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*：歯垢中9%，咽頭粘膜上14%，舌上13%，*Klebsiella oxytoca*：舌上16%）や緑膿菌（*Pseudomonas spp.*：歯垢中14%，舌上17%）も検出されました．さらにセラチア菌（*Serratia marcescens*）や黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*：MRSA；MSSA）も検出されました．

このような菌が検出された場合，歯科医師および歯科衛生士は，嚥下性肺炎のリスクが高いことなどを考慮し，除菌を念頭においた口腔ケアを進めていく必要があります．

一方で，このような菌は常在菌でもあり，全身の抵抗力とのバランスが崩れたために検出されているのかもしれません．逆に検出されていない人でも，抵抗力が下がって口腔にはじめて感染したときに，重い感染症を発症するかもしれません．これらのことは，現在研究段階にあります．

また，口腔からセラチア菌や黄色ブドウ球菌が検出されたことで高齢者を無用に不安にさせてしまうこともあるので，日和見菌の検出が認められたからといってすぐに病気の発症と直接つなげるのではなく，その結果を口腔ケアを行うモチベーションとして利用していけばよいのではないかと考えます．

生化学検査（唾液の検査）

1．唾液の働き

唾液中にはさまざまな抗菌性物質が含まれており，病原性細菌が異常増殖しないように抑えています．また，成長因子のような活性物質も含まれており，口腔粘膜や歯周組織が傷害を受けたときはその修復を助けます．

歯周病の進行により炎症が起きたり歯周組織が破壊されたりすると，唾液中に血液や歯周細胞から破壊産物が湧出したりします．炎症を抑え，タンパク質や口腔バイオフィルム形成を調節するような物質も含まれます．

2．生化学検査の種類

唾液中の成分をすべて検査していけば，さまざまな情報から齲蝕および歯周病のリスク判定を行えるかもしれません．しかし，簡便性や経済性を考えると，焦点を絞った検査が有用となるでしょう．また，チェアサイドで行えることもポイントとなります．

現在利用できる生化学検査を**図9**に示しました．

3．生化学検査の実施例

多くの粘着性の高いバイオフィルムが歯表面に形成され，糖を分解して酸産生細菌により酸が頻繁に生成されるようになると，唾液のpHが低下してきます．pHが低下すれば，歯質が脱灰されやすいうえ*S. mutans*のような耐酸性菌が優勢となってきます．

歯科医院で行われた101人の唾液pH検査の結果，pH6.0～6.6の唾液を有する人はpH7.2以上の唾液を有する人よりも唾液*S. mutans*量が多いことが明らかになりました（**図10**）．このように唾液pHが低い人は，より齲蝕のリスクが高いことが考えられます．

また，唾液のおもな能力として緩衝能があります．唾液の緩衝能とは，一過性のpH低下をもとの中性まで戻す能力のことです．この緩衝能の低下も齲蝕リスクを高めることになるでしょう．このように，口腔疾患が発症すると，唾液中になんらかのシグナルが送られてきます．それを生化学的な手法を用いて検査し，正常値と比べることによって，間接的ですがリスク判定の情報となると考えます．

このような検査が各歯科医院で行われ，蓄積されたデータを解析していけば，微生物・

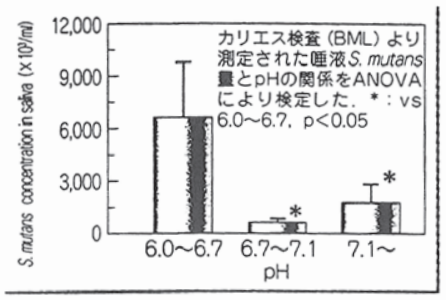


図10　唾液pHの変動と*S. mutans*量との関係

生化学検査がより有用なものになっていくと考えています．

現在では，情報技術の進歩により歯科医院，大学，研究所のネットワークを構築しやすくなり，それぞれの利点を活かした検討や情報交換を行うことが可能です．今後のお互いのつながりが，歯科界の新しい道を築きあげることになるでしょう．

何か協力できることや疑問点などありましたら，私たちの研究室（hsenpuku@nih.go.jp）へぜひご連絡いただきたいと思います．

参考文献

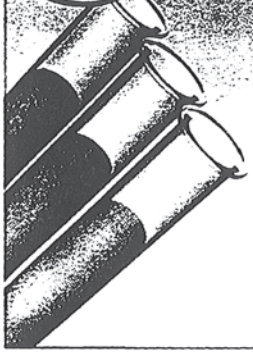
1）泉福英信，花田信弘：総説・齲蝕の原因と対策；21世紀の歯と全身の健康を考える．感染・炎症・免疫，**30**：2～10．1999.

2）Takeuchi, H., Senpuku, H., Matin, K., Kaneko, N., Yusa, N., Yoshikawa, E., Ida, H., Imai, S., Nisizawa, T., Abei, Y., Kono, Y., Ikemi, T., Toyoshima, Y., Fukushima, K., Hanada, N.：New dental drug delivery system for removing of mutans streptococci from the oral cavity: effect on oral microbial flora. *J. J. Infect. Dis.*, **53**：211～212. 2000.

3）Takeuchi, H., Fukushima, K., Senpuku, H., Nomura, Y., Kaneko, N., Yano, A., Morita, E., Imai, S., Nisizawa, T., Kono, Y., Ikemi, T., Toyoshima, Y., Hanada, N.：Clinical study of mutans streptococci using 3DS and monoclonal antibodies. *J. J. Infect. Dis.* **54**: 34～36. 2001.

4）Noiri, Y., Ebisu, S.：Identification of periodontal disease-associated bacteria in the "plaque-free zone". *J. Periodontol.*, **71**: 1319～1326. 2000.

5）泉福英信，十亀　輝，由川英二，花田信弘：特別養護老人ホーム等施設内高齢者の口腔バイオフィルム内細菌群と全身疾患との関係，Bacterial Adherence研究会講演集，**14**：21～26．2000.



②微生物検査の実態

国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信
日本歯科大学衛生学講座・（株）ビー・エム・エル　由川英二

口腔疾患の診断や治療方針の決定，予防プログラムの構築には総合的な検査所見をもとにしたアプローチが重要です．歯科医師が積極的に臨床に検査を導入するためには，外注検査のインフラ整備が急務と考えられます．

しかし，歯科医院において検体検査を行おうとすると，技術的，時間的，経済的な問題や院内汚染などの問題もあり，現実的には大きな負担となります．そこで昨年より，インターネットと郵便を使った各疾患に対応する外注歯科検査をスタートしました．

ここでは，この外注検査の紹介と利用方法について簡単に紹介します．

培養法による齲蝕関連菌の検出（カリエス検査）

この検査では，**表1**の齲蝕原因菌の定量と同時に，問診，視診による口腔診査，唾液分泌量，唾液pHの測定を行い，その結果を総合的に集計して齲蝕リスク判定を行います．

1．唾液を採取する

唾液の採取方法を以下に示します．

①　事前に，口腔内清掃は唾液採取の1時間前までに行うように指導しておく．

②　対象者に採唾用ロートをつけたスピッツを持たせて，5分間採唾液用専用ガムを噛ませながら唾液を採取する．

③　5分間流量，唾液の質をチェックシートに記録し，検体提出用スワブの滅菌キャップつき綿棒を唾液に10秒間浸し検体とする．

2．総検査項目を調べる

つづいて，①1日の飲食回数，②フッ化物使用状況，③プラークの量，④齲蝕の経験（DMFT），⑤唾液の量（ml/5分），⑥唾液のpHを調べます．この結果は，スコア換算表（**表2**）に基づいて記録することができます．

①　1日の飲食回数（問診）：飲食後に適切な口腔清掃を行わないと，口腔内に残った食渣（特に糖分）を栄養源として微生物が増殖し歯垢が形成されます．飲食回数と齲蝕発症が相関するという疫学調査報告があります．

②　フッ化物の使用状況（問診）：フッ素には齲蝕予防効果があります．フッ化物入りの歯磨剤・洗口剤の使用状況や，歯科医院でのフッ化物塗布などについて問診し記録します．

③　プラークの量（視診）：プラークの付着状況を視察し記録します．

主観的になりますが，**表2**に書いてあることを基準にして記録していきます．

④　DMFT（視診）：永久歯の齲蝕の数，喪失歯の数，治療終了歯の数を合計した数字です．1999年の平均は12歳で2.44，18歳で7.15です．

表 1　歯科検査一覧

検査項目	培養法による齲蝕関連菌の検出	PCR法による齲蝕・歯周病関連菌の検出	培養法による口腔の日和見菌の検出
検査目的	齲蝕のリスク判定	難治性齲蝕診断の補助 歯周病診断の補助	高齢者の口腔清掃状況の確認
検査材料	唾　液	ペーパーポイントまたは唾液	歯　垢
検査内容	以下の菌数または比率を調べる ①総レンサ球菌数 ②ミュータンスレンサ球菌数 （含ソブリヌス菌） ③①と②の菌の比率 ④乳酸桿菌数	以下の菌の有無を調べる 【齲蝕関連菌】 ①*S. mutans* ②*S. sobrinus* 【歯周病関連菌】 ①*A. actinomycetemcomitans* ②*P. gingivalis* ③*P. intermedia* ④*B. forsythus*	以下の菌の有無を調べる ①ＭＲＳＡ ②ＭＳＳＡ ③緑膿菌 ④β溶連菌 ⑤肺炎球菌 ⑥*H. influenzae* ⑦*K. pneumoniae* ⑧*S. marcescens* ⑨*B. catarrhalis* ⑩カンジダ
所要日数	6日	7～10日	7～10日
検査料金	キット料金に含まれる （1症例：3,000円）	DNA 抽出等 前処理：3,000円 PCR検出（1菌種）：各3,000円	キット料金に含まれる （1症例：3,000円）
キット内容	①採取手順書　1枚 ②チェックシート　10枚 ③郵送用専用封筒　10個 ④採唾液用ｽﾋﾟｯﾂ（ﾒﾓﾘ付）　10個 ⑤検体提出用スワブ　10個 ⑥採唾液用ロート　10個 ⑦刺激唾液採取用補助剤　10個 ⑧ｐＨ試験紙　10枚	①採取手順書　1枚 ②チェックシート　5枚 ③郵送用専用封筒　5個 ④採唾液用ｽﾋﾟｯﾂ（ﾒﾓﾘ付）　5個 ⑤検体提出用ｽﾋﾟｯﾂ(ﾁｭｰﾌﾞ入）5個 ⑥採唾液用ロート　5個 ⑦刺激唾液採取用補助剤　5個 ⑧唾液分注用スポイト　5本 ⑨フタ固定用パラフィルム　5枚	①採取手順書　1枚 ②チェックシート　10枚 ③郵送用専用封筒　10個 ④検体提出用スワブ　10個
キット料金	1キット10症例分：30,000円	1キット5症例分：5,000円	1キット10症例分：30,000円
利用方法	検査キットを購入する チェックシートに必要事項（患者名・採取日等）を記入し，診療時に確認する項目をチェックする 検体を採取する	検査キットを購入する チェックシートに必要事項（患者名・採取日等）を記入し，測定目的菌の□にチェックをする	検査キットを購入する チェックシートに必要事項（患者名・採取日等）を記入する
	ＢＭＬのホームページ（http://www.bml.co.jp/）を開き依頼入力をし送信する		

表 2　スコア換算表

スコアとリスク判定 / 検査項目	0 ノーリスク	1 ローリスク	2 リスク
1日の飲食回数	3回以下	4回	5回
フッ化物使用状況（自宅）	0	1	2，3
（医院）	している（0）	ときどき（1）	していない（2）
プラークの量	している（0）	ときどき（1）	していない（2）
齲蝕の経験（DMFT）	プラークなし	歯肉の境目に薄い膜のようなプラークがある	歯肉の境目に沿ってプラークがついているのが見える．歯と歯の間にはない
唾液の量（ml/5分間）	0	1，2，3	4，5
唾液の緩衝能	10.1 ml 以上	10.0～6.1 ml	6.0～3.6 ml
唾液の pH	即青	青	緑
	7.4 以上	7.2～6.8	6.6～6.4

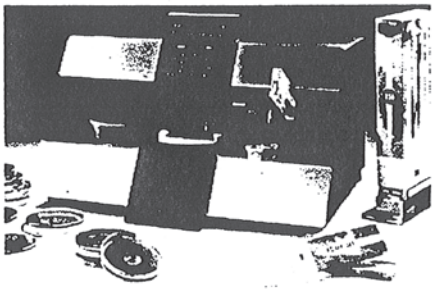


図1　スパイラルシステム．菌の入った試料を一定量培地に塗布するロボットのような装置．菌を定量する場合に必須である

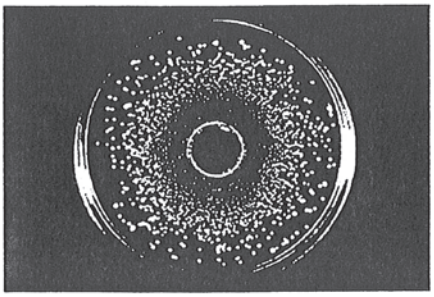


図2　培養後，培地上に発育したコロニー

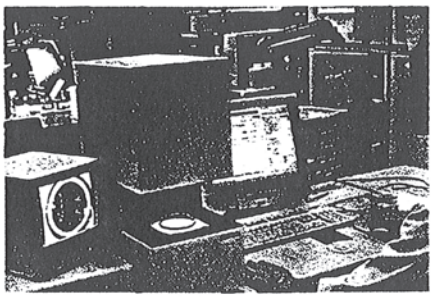


図3　コロニーカウンター．画像処理によりコロニーを自動的にカウントする

⑤　唾液の量（m*l*/5分間の測定）：専用ガムを5分間噛んだときに分泌される唾液量を測定します．唾液の分泌が少ない人は，齲蝕が多発するといわれています．

⑥　唾液のpH（pH試験紙）：齲蝕が多いとヒトの唾液は酸性に傾きます．唾液のpHが下がり数値が5.5以下になると，エナメル質が溶かされて齲蝕を招きます．

3．測定方法

BMLでは，送られてきた唾液の菌数を以下の方法で測定しています．

①　検体を3m*l*のPBS入り試験管に移し，ダイレクトミキサーで15分間振動させ，綿球より菌を剥離し菌の浮遊液を作成する．

②　得られた浮遊液をスパイラルシステム（グンゼ⑭）（図1）を用いて，MS改良培地・MSB改良培地およびラクトバチルス専用培地に塗布する．

③　48時間嫌気培養後，コロニー数を測定する（図2，3）．

図4　カリエス検査の報告書．各項目の結果が記載された報告書をインターネットを通じて手に入れることができる

4．「カリエス検査報告書」から齲蝕リスクを判断する

このような検査結果を総合して，BMLで「カリエス検査報告書」(図4)が作成されます．そのなかのカリエスチャートから齲蝕リスク

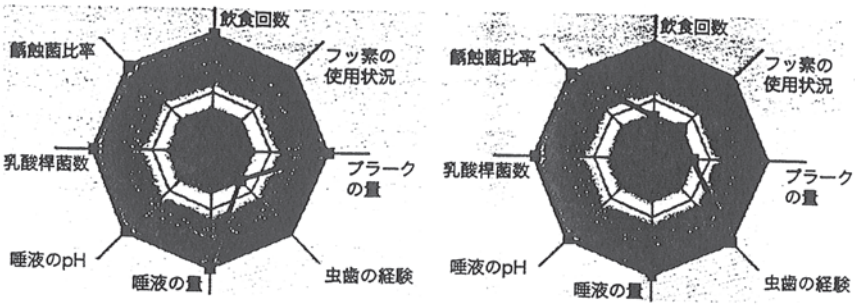


図5-1　齲蝕リスクの高くないパターン
図5-2　生活習慣が悪く齲蝕リスクがすこし上がったパターン

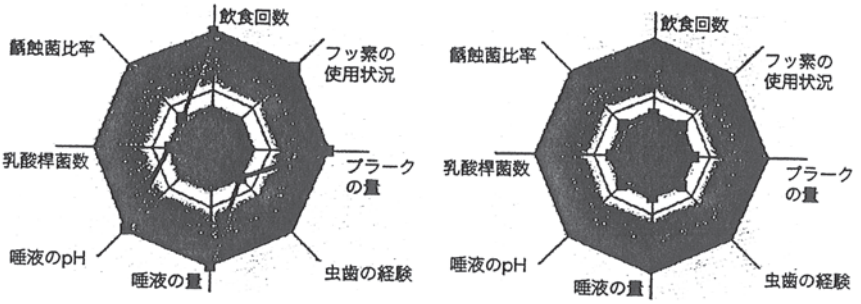


図5-3　齲蝕関連菌が多く齲蝕リスクがすこし上がったパターン
図5-4　生活習慣も齲蝕関連菌も悪いパターン．もっとも齲蝕リスクの高いパターンである

を判断することができます（図5）．

チャートの項目にある乳酸桿菌は，酸性の環境を好む細菌で，齲蝕の進行に大きくかかわっていると考えられています．またミュータンス菌が口腔内の総レンサ球菌に占める割合（齲蝕菌比率）が多いほど，齲蝕リスクが高いと考えられています．

PCR法による齲蝕・歯周病関連菌の検出

この検査では，PCR（polymerase chain reaction：ポリメラーゼ連鎖反応）法により，検出目的菌の遺伝子を増幅し口腔内における目的菌の有無を検査します（表1）．

1．PCRの原理

①　2本鎖DNAを鋳型として，特定領域を挟むように短いプライマーを各相補鎖にハイブリッド結合させ，基質である4種類のdNTPの存在下でDNAポリメラーゼを作用させる．

②　このプライマーの3'末端に鋳型の塩基配列にしたがってヌクレオチドが添加され，鎖が伸長する．

③　この反応でできた新たな2本鎖DNAを加熱して相補鎖に分離し，過剰に存在するプライマーをふたたび該当位置にハイブリッド結合させ，DNAポリメラーゼ反応で新たなDNA鎖を合成させる．

④　この反応を繰り返すことで，目的領域を含むDNA断片を大量に得ることができる（図6）．

2．検体を採取する

この検査では，唾液とペーパーポイントが検体となります．採取方法は次のとおりです．

●唾　液

①　口腔内清掃は唾液採取の1時間前までに行うように指導しておく．

②　対象者に採唾用ロートをつけたスピッツを持たせて，5分間専用ガムを噛ませながら

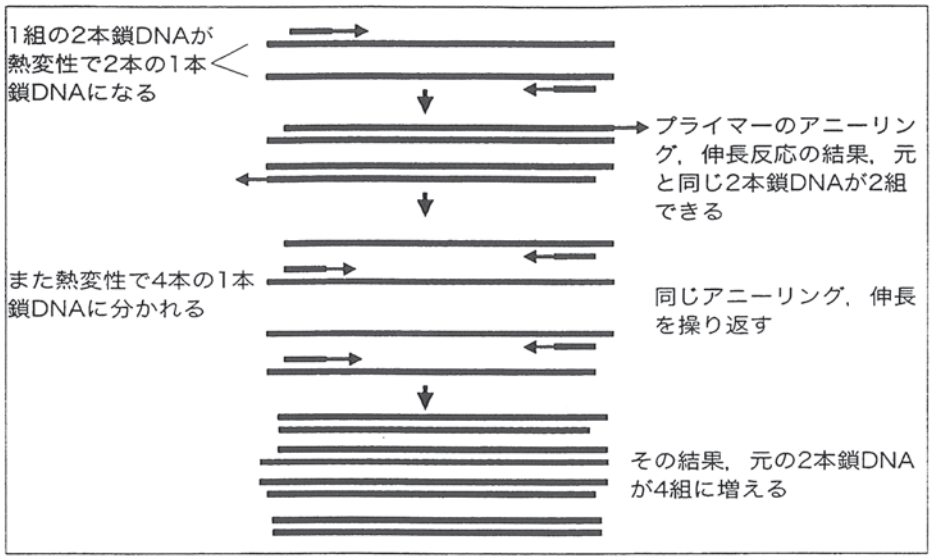


図6 PCR増幅の原理

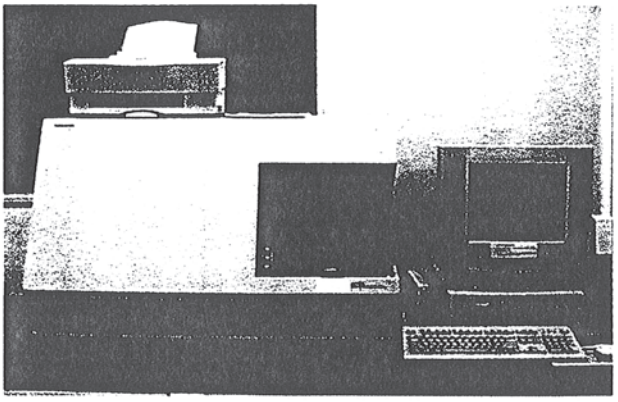


図7 リアルタイムPCR定量装置（ABI PRISM 7700）

ら唾液を採取する．

③ 採取した唾液0.5 mlを同封のスポイトでヌンクチューブに入れ，パラフィルムでフタを固定し，ポリスピッツに入れる．

●歯周ポケット

① 滅菌した綿球かキュレットで縁上のプラークを除去し防湿する．

② ペーパーポイントの先端を歯周ポケット底部まで挿入し（ポケットの大きさに合わせて数本挿入），そのままの状態で10秒間待ち，同封のヌンクチューブに入れパラフィルムでフタを固定し，ポリスピッツに入れる．

3．測定方法

BMLでは送られてきた検体よりDNAを抽出し，タックマンプローブを用いたリアルタイムPCR定量装置（ABI PRISM7700）で測定します（**図7**）．

4．検出感度についての評価

各菌種ごとに純粋な抽出DNA溶液を段階希釈してPCR反応後，アガロースゲル電気泳動を行った場合，ほとんどの菌種で10fg程度の値までは検出できます．100fgあれば安定して検出されるものと考えています．

これが菌数にしてどれくらいかということですが，ヘリコバクター・ピロリ菌のゲノムDNA量を換算してみた例があります．この場合，1菌体当たり約8fgと見積もっています．

ほかの口腔内細菌も，ゲノムDNA量はオーダーを隔たっての差異まではないと仮定すると，10fgまで検出可能であることは，数十個の菌の存在までとらえているものと考えられます．

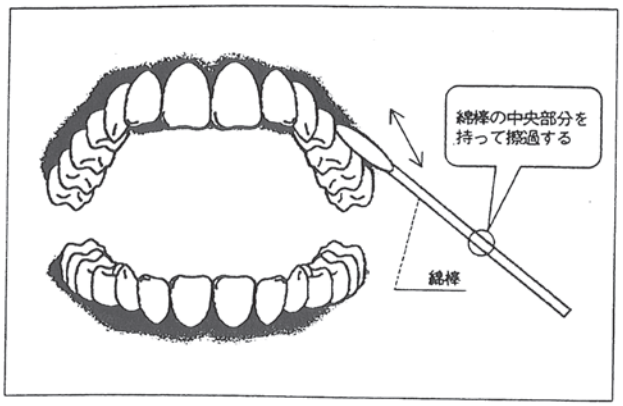


図8　歯垢の採取方法

ただし，実際にごく少量の菌体から100%効率よくDNAを抽出することは難しく，特に齲蝕菌のようにグルカン形成をする菌種の場合にはかなり効率は低下するものと思われます．

そのようなロスがあって仮に約10%しか回収できなかったとしても，およそ数百個の菌がテストチューブに供されれば検出可能と考えてよいかと思います．

培養法による口腔の日和見感染菌の検出

この検査では，歯垢を検体として，口腔細菌（好気性菌）の培養・同定を行います（**表1**）．

1．歯垢を採取する

対象者の⌊５６７の頬側歯頸部の歯垢をスワブの滅菌キャップつき綿棒で数回（5往復）擦過し，さらに綿棒の綿球を180度回転し数回（5往復）擦過後，キャリブレアーチューブに投入します（**図8**）．

2．測定方法

BMLでは，送られてきた検体を以下の方法で培養・同定します．

表 3　確認培地および同定キット

MRSA	psラテックス（栄研），ウサギプラズマ（栄研），MRSAスクリーニング培地（BD）
MSSA	psラテックス（栄研），ウサギプラズマ（栄研），MRSAスクリーニング培地（BD）
緑膿菌	VITEK（BVJ）
β溶連菌	セロアイデンストレプトキット（栄研），APIストレプト（BVJ），VITEK（BVJ）
肺炎球菌	肺炎球菌鑑別用ディスクタキソPディスク（BD）
H. influenzae	ヘモフィルスID4分画（BD）
K. pneumoniae	VITEK（BVJ）
S. marcescens	VITEK（BVJ）
B. catarrhalis	IDテストHN20（日水）
カンジダ	カンジダチェック（ヤトロン）

①　検体を，血液寒天培地，BTB培地，チョコレート寒天培地，OPA培地，PASA培地，サブロー寒天培地（すべてBD）の培地に塗布する．

②　24～48時間，炭酸ガス培養する．

③　目的とする菌のコロニーを**表3**の確認培地および同定キットを用いて同定する．

このような検査方法の普及により，従来型の歯科医療から脱却して21世紀型の歯科治療および予防方法は，データを中心にエビデンスに基づいた歯科医療へと転換していくことになるでしょう．

その際に，歯科衛生士の役割は重要になってきます．一つひとつのデータを丹念にとることにより，いままで曖昧だった部分が明らかになり新しい治療および予防方法が確立されていくと考えます．歯科医療におけるビックバンが起こる日もそう遠くないでしょう．

●齲蝕・歯周病関連菌

■齲蝕関連菌■

①***Streptococcus mutans***（gtfB遺伝子陽性の代表的菌種）：α-あるいはγ-溶血性の連鎖球菌でヒトの口腔に生息し，もっとも重要な齲蝕病原菌とされています．ソルビット，マンニットを分解し，スクロースから非水溶性でかつ粘着性のα-グルカンを産生し，菌体は歯の固表面に強く付着．多くの糖類を分解し乳酸などを産生して歯の硬組織を溶解します．

②***Streptococcus sobrinus***（gtf Ⅰ遺伝子陽性の代表的菌種）：齲蝕の約20%に，*S. mutans*とともに*S. sobrinus*が分離され，*S. mutans*単独の場合よりも齲蝕の度合いが重度と評価されています．

■歯周病関連菌■

①***Actinobacillus actinomycetemcomitans***：小さな，球形に近い，非運動性，非芽胞産生性，糖分解性，好二酸化炭素性，通性嫌気性，グラム陰性の，両端の丸い桿菌．限局型若年性歯周炎の病巣から比較的高率に検出され，健康な，あるいは軽度にしか罹患していない患者の歯肉縁下プラークからの検出率は低いとされています．

②***Porphyromonas gingivalis***：黒色色素産生性バクテロイデス属に入り，これらは偏性嫌気性，グラム陰性，非芽胞産生性，非運動性桿菌で，血液培地で増殖すると，褐色あるいは黒色に着色したコロニーを作ります．進行した成人性歯周炎の病巣から，また，広汎型若年性歯周炎の病巣からも分離されます．歯肉の炎症の程度と歯肉縁下プラークに占める本菌の比率との間に相関関係があることも明らかにされています．対照的に，健康人あるいはまだ歯周炎に罹患していない歯肉炎患者の歯肉縁下試料からはまず検出されません．

③***Prevotella intermedia***：黒色色素産生性バクテロイデス属に入り，進行した歯周炎患者のポケットから，しばしば多数の*P. gingivalis*といっしょに分離され，単独に存在することはまれです．*P. intermedia*は歯肉炎患者および健康な歯周組織をもつヒトの半数以上に存在しています．

④***Bacteroides forsythus***：グラム陰性，非運動性，初期には球菌様を呈する嫌気性桿菌ですが，時間が経つと，通例先のとがった両端と膨れた中心部を示すようになります．本菌は歯肉炎や健康部位，または疾患の軽快した部位に比べ，歯周組織破壊の激しい部位で高率に検出されます．また，表在性や非活動性の病巣よりも，深在性で活動性の歯周病病巣でそれが顕著です．難治性歯周炎の指標として重要な菌種です．

●日和見感染菌

①***Haemophilus influenzae***：グラム陰性の小さな球桿菌で，莢膜を有する株もいます．通性嫌気性，非運動性，カタラーゼ陽性，オキシダーゼ陽性，X因子（ヘミン）とV因子（NAD）を発育に必要とします．慢性気道感染症の急性増悪の原因菌となり，肺炎を起こすこともあります．また，小児においては化膿性疾患を起こすこともあります．

②β溶連菌：呼吸器感染症の原因菌として重要な*S. pyogenes*（A群溶連菌）が含まれます．グラム陽性の連鎖状の球菌で，通性嫌気性，非運動性，カタラーゼ陰性，5%ヒツジ血液寒天培地に透明な溶血環を作ります．*S. pyogenes*は化膿性炎症を起こす代表的な菌種であり，咽頭炎，扁桃炎，敗血症などを起こします．

③緑膿菌（***Pseudomonas aeruginosa***）：グラム陰性の桿菌で，偏性好気性で運動性があり，オキシダーゼ陽性，ブドウ糖を酸化的に分解します．自然界に広く分布し，健常者には本来病原性の弱い菌ですが，入院患者，基礎疾患のある患者に対し難治性感染症を引き起こす院内感染の原因菌です．

④肺炎球菌（***Streptococcus pneumoniae***）：グラム陽性の双球菌で莢膜を有し，カタラーゼ陰性，オプトヒン感性，胆汁溶解テスト陽性．口腔咽頭に常在しますが，肺炎を起こす代表的な菌種でもあります．近年，ペニシリンに耐性を示す株が増加しており，投薬に注意が必要です．

⑤***Klebsiella pneumoniae***：グラム陰性の桿菌で莢膜を有し，通性嫌気性，非運動性，VPテスト陽性，寒天培地上で粘性のある大きな集落を作ります．院内感染菌の1つで，呼吸器と尿路の感染症の原因になることが多いのですが，ほとんどすべての部位でこの菌による感染症が発現します．

⑥***Serratia marcescens***：グラム陰性の桿菌で，通性嫌気性，運動性があり，DNaseを産生します．環境中に見られますが，尿路感染症や難治性肺炎など，日和見感染の原因菌となります．

⑦***Moraxella*（*Branhamella*）*catarrhalis***：グラム陰性の双球菌で，偏性好気性．この菌の多くはβラクタマーゼを産生しペニシリンなどに耐性を示します．鼻咽腔粘膜に常在しますが，しばしば呼吸器感染症，中耳炎，結膜炎の原因菌となります．

⑧MRSA・MSSA（***Staphylococcus aureus***）：グラム陽性の球菌で，通性嫌気性，カタラーゼ陽性，コアグラーゼ陽性，寒天培地上で淡黄色～黄色の集落を作ります．ヒトの鼻腔内に常在することもありますが，院内感染原因菌として重要で，罹患率死亡率ともに高く注意する必要があります．*S. aureus*はメチシリンに対する感受性の違いにより，メチシリン感受性*S. aureus*（MSSA）とメチシリン耐性*S. aureus*（MRSA）に区分され，MRSAはメチシリン以外の多くの薬剤に耐性を示し，難治性の感染症に発展することもあります．

⑨***Candida spp.*（*Candida alibicans*，*etc*）**：グラム陽性の亜球形の菌で，偏性好気性，出芽により増殖し仮性菌糸を形成します．日和見感染，院内感染の原因菌の1つで，あらゆる部位にカンジダ症を引き起こします．代表的菌種として*C. albicans*があります．

③検査の活かし方

鶴見大学歯学部予防歯科学教室　野村義明
国立感染症研究所口腔科学部　泉福英信

口腔は直接目で見ることができます．検査技術を用いなくても齲蝕や歯周病の診断ができるわけです．そのため，歯科で行う検査は，医科で行われる血液検査などのような，検査値で病気の診断をしようとするものとはその意義が全く異なります．

現在歯科で利用できる検査は，患者さんが将来齲蝕や歯周病などになりやすいかどうかを予想するために行うものと考えてよいでしょう．

歯科検査を利用する目的はおもに3つあります．それは，ハイリスク者のスクリーニング，治療効果の判定，患者に対するモチベーションの獲得です．その3つの目的のなかで，特に重要なものがハイリスク者のスクリーニング，すなわち，将来齲蝕や歯周病になりやすい人を検査によって見分けることです．

モチベーション効果を得るために検査を利用するということもありますが，その場合，各検査値がいくつ以上であれば齲蝕になりやすいといえるのかをはっきりさせておく必要があります．

治療効果の判定に検査を利用する場合は簡単で，治療前と比較して治療後にその検査値が下がればよいわけですが，各検査値がいくつ以下になるまで治療を続けるかをはっきりさせておく必要があります．

この章では，ハイリスク者のスクリーニングに焦点をあてて検査結果の利用方法を解説します．

検査の意義を理解するための基礎知識

スクリーニングとしての検査は，疫学やEBM（エビデンス・ベースド・メディスン）でも利用されていて，きちんとした理論体系があります．

検査の理論を理解するために必要な知識を簡単に解説します．

1．定性検査と定量検査

検査には定性検査と定量検査があります．たとえば，日和見病原菌の検査は「定性検査」なのですが，歯垢のなかに日和見病原菌がいるかいないかしかわかりません．

それに対して，齲蝕の検査であるミュータンスレンサ球菌，乳酸桿菌の検査は「定量検査」であり，唾液の中にどれくらいの数の菌がいるのかがわかります．

定量検査では，検査値がいくつ以上でハイリスクとするのかを決めなければなりません．そのためにはいくつかの基本的な疫学の理論を理解しておく必要があります．

次に，感度，特異度，ROC曲線についてまとめてみます．

2．疫学理論の基本

①「感度」と「特異度」

「感度」は「病気である患者さんを病気である」と診断できる確率で「特異度」は「病気でない人を病気でない」と診断できる確率です．

完璧な検査であれば，感度も特異度も100％になりますが，実際には，「病気である人を病気でない」と判断してしまうこともあります．このことを「偽陰性」といいます．

逆に「病気でない人を病気である」と判断してしまうことを「偽陽性」といいます．

皆さんも，健康診断で「再検査の必要がある」と診断されて再検査を受け，その結果「健康」と診断されてほっとしたという経験があるかと思います．これが「偽陽性」です．

現在歯科で利用されている細菌検査のなかには，確定診断ができるものはありません．ですから，いくらミュータンスレンサ球菌の値が高くても，必ず齲蝕になるとはいえないわけです．あくまでも「齲蝕になる確率が高い」ということしかいえません．

② ROC曲線

上記の感度と特異度の値を使って，各検査結果でどの値から「異常」または「ハイリスク」と診断するかを決めていきます．感度，特異度を使ってROC（Receiver Operating Characteristic Curve）を書いて，どの値から異常とするかを決めるのです．

図1にROC曲線の例を示します．この図では感度，特異度がもっとも高くなる点で検査値の基準を決めます．この点をカットオフポイントといいます．この検査の理論は奥が深いので，さらに勉強したい人のために参考文献をあげておきます（p. 514参照）．

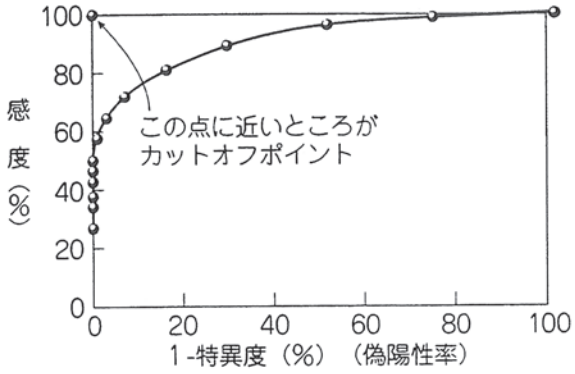


図1 ROC曲線

検査結果の実用例

齲蝕検査の結果の実用例を紹介します．齲蝕に対する検査でおもに用いられている検査は，ミュータンスレンサ球菌と乳酸桿菌が，唾液の中にどれくらいいるのかを調べる定量検査です．

「②検査の実態」（p. 504～510）にも解説がありますが，ミュータンスレンサ球菌の検査方法には，簡易キットを使う方法と，ミュータンスレンサ球菌を培養することによって正確にその量を定量する方法があります．

まず，簡易キットを利用した検査ですが，簡易キットであるDentocult SM，Dentocult LBについては，多くの臨床研究の結果が蓄積されています．Dentocult SM，Dentocult LBは，菌の量に応じてレベル0，1，2，3と判定するものです．どちらもどのレベルからハイリスクと診断するかが問題になります．

1．日吉歯科診療所でのDentocult SM，Dentocult LBの活用方法

山形県酒田市の日吉歯科診療所通院患者の

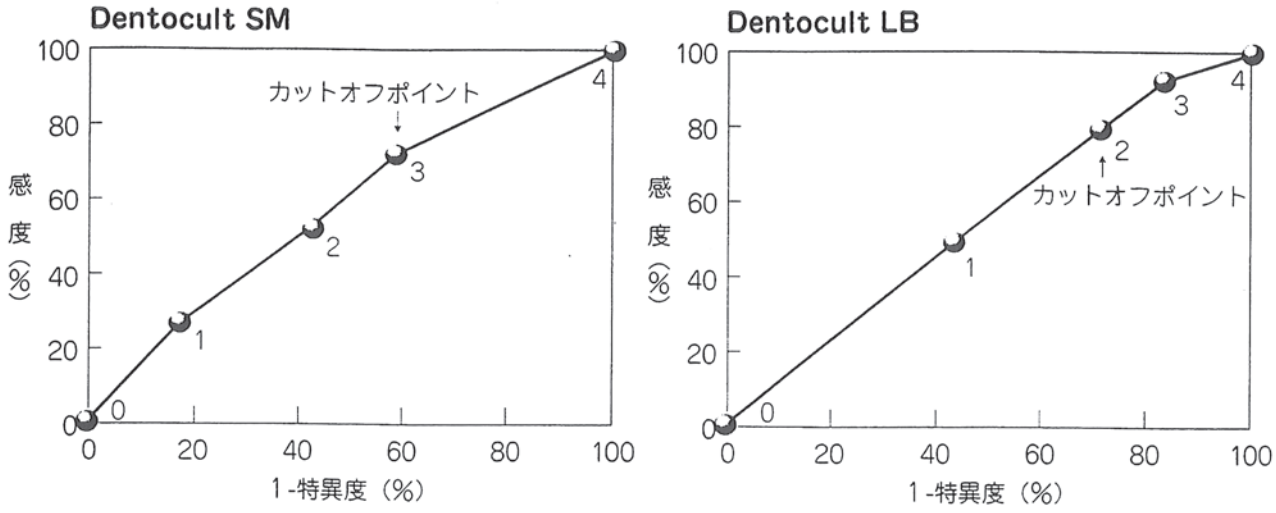


図2　初診時の検査結果によるROC曲線

うち，年齢が20歳以下で齲蝕治療を終了し口腔衛生指導を行った患者2,131名のデータのなかから，初診時，治療終了時，メインテナンス時にリスク因子の評価を行った1,664名の患者データを使用して，メインテナンス期間中に新規に齲蝕が発症した患者と発症しなかった患者を比較検討しました．

初診時のDentocult SM，Dentocult LBの結果から，感度，特異度を計算してROC曲線を描いたものが**図2**です．この図から，Dentocult SMでのカットオフポイントはレベル3です．つまり，レベル3の患者さんはハイリスクといってよいでしょう．

また，Dentocult LBではレベル2がカットオフポイントなので，レベル2，3の患者さんはハイリスクといってよいでしょう．

2．あくまでも総合的な判断が必要

ただし，ここで注意しなければいけないのは，ハイリスクであるからといって必ず齲蝕が発症するわけではないということです．あくまでも将来齲蝕が発症しやすいということしかいえません．逆に，ハイリスクでないから，絶対に齲蝕が発症しないということもいえません．将来齲蝕にはなりにくいということしかいえないのです．

前述のように，齲蝕は多因子性の疾患ですから，細菌検査の結果だけから齲蝕のなりやすさを判断せず，総合的な判断が必要です．その意味からも，フッ素の使用状況や間食の回数などを問診していくことも大切です．

ミュータンスレンサ球菌がいくつ以上あれば「ハイリスク」か?

ミュータンスレンサ球菌を培養法によって定量する方法は，利用可能になって間もないため，まだ十分なデータの蓄積がありません．

ミュータンスレンサ球菌がいくつ以上あるとその人が齲蝕が発症しやすいかをエビデンスをもって語ることはまだできないので，当面，齲蝕の指標（Caries Indicator）としてとらえ，話を進めます．

ミュータンスレンサ球菌は，口腔内に存在しなくても問題の生ずる細菌ではありませ

ん．この点は議論のあるところですが，口腔内の常在菌でもありません．よって，唾液または歯垢中のミュータンスレンサ球菌数の正常値は，0または検出限界以下です．

問題はいくつ以上であればハイリスクと診断するかです．BMLの基準では，唾液中の乳酸桿菌数と総レンサ球菌中のミュータンスレンサ球菌の割合から表のような基準を設定しています．

国立感染症研究所では，ハイリスクの基準値を設定するために疫学データや臨床データを集積しています．現在のところ総レンサ球菌中のミュータンスレンサ球菌の割合が1～2%のところに基準値があるようですが，この値は患者さんの年齢や地域によって異なります．なぜなら，地域ごとに地域保健で行われている予防プログラムが異なり，各歯科医院ごとに定期管理による予防プログラムの内容が異なるからです．

最終的には各地域ごと，また各歯科医院ごとにその値を決めなければならないでしょう．

表　BMLの齲蝕リスクの判定基準

スコア	0	1	2	3
乳酸桿菌数	10,000未満	10,000～100,000	100,000～300,000	300,000以上
齲蝕菌比率(%)	0.1未満	0.1～1.0	1.0～5.0	5.0以上

齲蝕検査から治療効果を判断する

次に，齲蝕検査を治療効果判定に使用する場合の利用方法について説明します．

クロルヘキシジンのような抗菌性物質を使用したときに，唾液や歯垢中のミュータンスレンサ球菌を調べることによって抗菌性物質使用の効果を判定することができます．

PMTCに併用して抗菌性物質が適切に使用されていれば，ミュータンスレンサ球菌は検出限界以下になります．

私たちのデータでは，その効果が約3カ月間持続するようです．

また，抗菌性物質を使用せずPMTCだけでも，処置直後にはミュータンスレンサ球菌は検出限界以下にすることができます．しかし，抗菌性物質を使用しないと2～3週間でその値は術前の値に戻ってしまうようです．

現在利用できる細菌検査と，その結果を患者に説明するときに参考になることを解説しました．齲蝕検査は定量検査ができますが，基準値の設定は現在検討中です．

今後皆さんもデータを蓄積して，研究者が設定する基準を参考にしながら各医院ごとの基準値を設定できるよう努力していただけたらと思います．

参考文献

1）木原正博監訳：医学研究のデザイン．研究の質を高めるための疫学的アプローチ．メディカル・サイエンス・インターナショナル，東京，1997.
2）青山英康編：今日の疫学．医学書院，東京，1996.

花田信弘（はなだのぶひろ）　〒162-8640　東京都新宿区戸山1-23-1　国立保健医療科学院口腔保健部　Tel 03-5285-1111
泉福英信（せんぷくひでのぶ）　〒162-8640　東京都新宿区戸山1-23-1　国立感染症研究所口腔科学部　Tel 03-5285-1111
由川英二（よしかわえいじ）　〒151-0051　東京都渋谷区千駄ヶ谷5-21-3　株式会社ビー・エム・エル　Tel 03-3350-0115
野村義明（のむらよしあき）　〒230-8501　横浜市鶴見区鶴見2-1-3　鶴見大学歯学部予防歯科学教室　Tel 045-581-1004