

肺炎の原因菌の診断法の進歩

野口 真吾¹⁾・迎 寛²⁾

¹⁾ 産業医科大学医学部呼吸器内科学*

²⁾ 長崎大学医歯薬学総合研究科医療科学専攻呼吸器内科学 (第二内科)

受付日: 2018年1月31日 受理日: 2018年2月6日

肺炎診療においては原因菌の正確な情報が重要な因子であるが、喀痰培養を中心とした従来の原因菌検索では、肺炎の真の原因菌かどうかを判断することは難しい。また、原因菌の迅速診断法の発展に伴い、こうした培養法に加えて、イムノクロマト法を用いた抗原検出や遺伝子検査も保険診療のなかで行うことが可能となったが、これら検査法の利点は特定の菌種に限定される。いっぽう、近年では、大量の塩基配列を短時間で解析可能である次世代シーケンサーの出現により呼吸器疾患の下気道細菌叢に関する報告が散見されるが、われわれの施設では、サンガー法にクローン・ライブラリー法を組み合わせることにより、市中肺炎、医療介護関連肺炎、院内肺炎患者の気管支洗浄液の細菌叢の検討を行った。その結果、従来から知られている原因菌に加えて、口腔内レンサ球菌や嫌気性菌がこれまでの既報と比較しより重要な役割を果たしている可能性が示された。また、口腔内レンサ球菌は、高齢者、全身状態が不良な患者において、より多く検出される可能性が示唆された。さらに、近年原因菌であるか否かが議論されている MRSA や緑膿菌などの耐性菌については、細菌叢解析の結果、培養法ではこれらの菌種の原因菌としての関与が過大評価されている可能性が示唆された。

Key words: pneumonia, causative pathogen, cultivation method, clone library analysis

はじめに

.....

喀痰培養を中心とした従来の感染症における原因菌検索では、良質な検体の採取や適切な保存方法、および、培養条件などが重要である。特に培養が困難な菌の場合などではしばしば原因菌が不明となるため、十分な検査法とはいえない。また、嫌気性菌の関与が多い呼吸器感染症としては肺化膿症や誤嚥性肺炎がよく知られているが、実臨床では嫌気性菌の培養が困難なことが多く、呼吸器感染症における原因菌としての嫌気性菌の正確な頻度やその重要性については未だ不明な部分が多い。また、口腔レンサ球菌も口腔内常在菌として処理されることが多く、呼吸器感染症の原因菌としての判断は難しい。近年、さまざまな原因菌評価の手段が発展しており、特に、16S リボソーム RNA (ribosomal RNA ; rRNA) 遺

伝子を用いた分子生物学的手法の有用性が明らかとなっている。われわれは、産業医科大学微生物学教室と共同でこの 16S rRNA 遺伝子を用いた細菌叢解析法という手法を用い、これまでに肺炎における原因菌の検討を行ってきた^{1,2)}。

今回、肺炎診療で施行可能な原因菌検査法について概説するとともに、われわれが行っている細菌叢解析法のデータについて紹介する。

1. 現在施行可能な検査法

1. 培養法

培養法は、呼吸器感染症における原因菌同定において最も標準的な手法として日常的に用いられている。実際には、喀痰をはじめとする検体を採取することから始まるが、得られた検体に対してグラム染色を行うことである程度の菌種の推定が可能である。その後、培養を行い原因菌の同定を行う。培地には、

*福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1

Table 1. The antigen and genetic diagnostic methods for pneumonia used in clinical practice

| Antigen detection method | | Genetic diagnostic method | |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Pathogen | Specimen | Pathogen | Specimen |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Urine, throat swab, sputum | <i>Legionella pneumophila</i> | Respiratory specimens |
| <i>Legionella pneumophila</i> | Urine | <i>Bordetella pertussis</i> | Nasopharyngeal swab |
| <i>Influenza virus</i> | Nasal cavity swab | | |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Throat swab | | |
| <i>Respiratory syncytial virus</i> | Throat swab | | |
| <i>Human metapneumovirus</i> | Throat swab | | |
| <i>Adenovirus</i> | Throat swab | | |

文献6)より引用改編

一般的な細菌を発育させる非選択培地と目的菌のみを発育させる選択培地がある。選択培地にはレジオネラ属の発育の培地としてB-CYE培地、マイコプラズマ属の発育の培地としてPPLO培地などがあり、推定される菌種の情報も培地の選択には重要である。また推定される原因菌により好気もしくは嫌気的条件下で培養を行う必要がある。さらに、培養検査の主な検体である喀痰に関しては、そもそも検体が採取できない可能性や、採取できたとしても唾液などの混入が不可避であるため、口腔内などの上気道の細菌の影響を受けることが問題となる。また、嫌気性菌やマイコプラズマなどの培養困難な菌種も存在し、加えて、培養には数日以上かかることから、肺炎診療では多くの症例で原因菌の同定にはいたらずにエンピリック治療で開始され、その後もエンピリック治療が行われる場合がよくみられる。実際、Putotらの報告³⁾では、いずれかの方法（喀痰・血液培養、血清・尿中検査など）による検体採取率は約90%程度であるのに対して、菌の陽性率は11.8%にとどまっており、喀痰に限定すると、喀痰採取率は15~20%、採取できた場合の菌の陽性率は半分以下であることが報告されている。また、実地臨床においては、緑膿菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA）などが検出された場合に、それらが肺炎における真の原因菌か否かの判断は未だにきわめて難しい問題であり、実際には喀痰培養の結果としてMRSAのみが検出される肺炎症例でも抗MRSA活性のない抗菌薬で治療効果が得られることは経験され、培養結果と治療効果の間には大きな乖離がある可能性に留意する必要がある⁴⁾。

2. 血清診断・抗原検出法

近年の原因菌の迅速診断法の発展に伴い、現在の

肺炎診療においては、Table 1に示すような病原体に対しては保険診療のなかで検査を行うことが可能である。市中肺炎の主要な原因菌の一つである肺炎マイコプラズマに関しては、主に血清抗体価による評価が用いられてきたが、現在、リボテスト[®]マイコプラズマなどといったイムノクロマト法を用いた抗原検出が可能となり、外来やベッドサイドにて評価することが可能となった。ただし、リボテスト[®]マイコプラズマの有用性に関して、Miyashitaらは、成人のマイコプラズマ肺炎患者118名の検討において、感度62.5%、特異度90.5%であったことを報告しているように⁵⁾、感度がそれほど高くないことが本キットの問題点として挙げられる。また、尿中抗原検査として、肺炎球菌やレジオネラ・ニューモフィラの評価が可能であり、成人肺炎診療ガイドライン2017においても肺炎の原因菌検索として尿中抗原検査を行うことが推奨されている⁶⁾。なお、尿中肺炎球菌抗原に関しては、肺炎発症後数カ月にわたって陽性が続く症例が存在することに注意を要する⁷⁾。また、レジオネラ肺炎は、重症化しやすいこと、 β -ラクタム系抗菌薬が無効であることから、本尿中抗原の有用性は高いと考えられるが、イムノクロマト法を用いた市販のキットではレジオネラ・ニューモフィラ血清型1のみが検出可能であり、その他の血清型のレジオネラ菌は検出できない点に注意が必要である。

3. 遺伝子検査

遺伝子診断法としては、肺炎マイコプラズマやレジオネラ菌に対してloop-mediated isothermal amplification (LAMP)法が保険診療で使用可能となっており、感度や迅速性において優れている⁶⁾。実際、LAMP法に関しては、Ishiguroらのマイコプラズマ下気道感染症の小児患者223名を対象とした検討

では感度 99.1%，特異度 100% であったことが報告されている⁸⁾。

II. 新たな検査法の試み

1. サンガー法を用いた細菌叢解析法

培養法では検出が困難な細菌感染症の原因菌に対して、生体試料の DNA を鋳型にプライマー (universal primer) を用いて直接 16S rRNA 遺伝子の断片を PCR 法で増幅し、得られた PCR 産物の塩基配列をサンガー法 (Sanger sequencing) を用いて決定することにより原因菌を推定する試みがなされるようになってきた^{9,10)}。さらに、上記に加えてクローン・ライブラリー法を組み合わせることにより、複数菌が存在する感染症に対しても解析が可能となり、原因菌を同定するという考えから感染病巣中の細菌叢を評価するという新たな概念が用いられるようになった^{11,13)}。サンガー法を用いた capillary sequencer により比較的長い塩基配列 (700~1,000 bp) を高い精度 (99.999%) で決定することが可能である¹⁴⁾。この精度であれば、一般に属 (genus) レベルであれば 94% 以上、種 (species) レベルであれば 97% 以上の相同性があれば同一である可能性が高いとされている¹⁵⁾。しかしながら、本法では大腸菌を用いたクローン・ライブラリーを作成する工程を要するため一定の所要時間を必要とし、大量の sample を一度に解析する場合は解析時間の短縮は難しいことが問題点として挙げられる¹³⁾。

2. 次世代シーケンサー

機種の違いにもよるが、次世代シーケンサー技術において処理する read 長は 100~600 bp と短いですが、1~1,000 million reads といった大量の塩基配列を迅速に解析することが可能であり、その正確性も 99% 以上と報告されている。1 回でより多くの細菌叢を解析しなければならない、もしくは多様性に富む細菌叢であることが予測される場合、個々の細菌種の情報よりも細菌叢の全体的なトレンドを把握する解析などでは大量の塩基配列を短時間で解析可能な次世代シーケンサーが適していると考えられる¹³⁾。いっぽうで、次世代シーケンサーの塩基配列解析の正確性は、個々の比較的短く質の低い read 長を大量に読み込んだうえでそれらを重ね合わせることで整合性や正確性を担保しており、それぞれの塩基配列の正確性はサンガー法に劣ると考えられることや、例えば他のストレプトコッカス属の菌種と

数塩基しか違いがない市中肺炎の原因菌として最も多く検出される肺炎球菌 (ストレプトコッカス・ニューモニエ) はストレプトコッカス属としてしか検出されないが、サンガー法ではストレプトコッカス・ニューモニエという菌種までの同定が可能であるため、個々の菌種を正確に同定するには現状ではサンガー法が優れていると考えられる。

III. 細菌叢解析からみた肺炎の検出菌

1. 細菌叢解析法の実際

細菌叢解析法とは 16S rRNA 遺伝子を PCR 法で増幅し、菌種を推定する方法である。16S rRNA 遺伝子の特徴としては、原核生物 (真正細菌および古細菌) のみが共通して保有していること、長さが約 1,500 bp 程度と比較的長いこと、菌種にかかわらず塩基配列が共通する保存領域 (conserved region) に universal primer を設定することで、PCR 増幅産物の可変領域 (divergent region) の塩基配列から菌種の推定が可能なことである。概要として、①検体中の細菌の菌体を破壊 (溶菌) する、②DNA の抽出・精製を行う、③universal primer を使用し 16S rRNA 遺伝子を PCR 法で網羅的に増幅する、④クローン・ライブラリーを作成する、⑤クローン化された増幅産物のおおのの塩基配列を決定する、⑥細菌の基準株の basic local alignment searching tools (BLAST) アルゴリズムを用いて得られたすべてのクローンに対してのおおのの相同性検索を行う、という 6 つの工程からなる。

2. 各種細菌性肺炎における主要な下気道の検出菌種

これまでに、「市中肺炎¹⁾」、「医療介護関連肺炎²⁾」、「院内肺炎¹⁶⁾」の各細菌叢について、肺炎病巣から直接採取した気管支肺胞洗浄液を用いて解析を行った (Table 2)。得られた細菌叢のデータのうち、第一優占菌種 (各症例の細菌叢のなかで最も多く検出された菌種) に注目して解析を行い、培養を中心とした既報と同様に、肺炎球菌やインフルエンザ菌など、市中肺炎や医療介護関連肺炎で多く検出される菌種に関しては、培養法、細菌叢解析法の両方でおおむね同様に検出された。また、院内肺炎では、原因菌として重要であることが知られているグラム陰性桿菌に関しても本解析法では同様の結果であった。いっぽうで、培養法ではしばしば口腔内常在菌として処理される傾向がある口腔レンサ球菌に関して、

Table 2. Comparison of bacteria (predominant phylotype) in the three types of pneumonia using clone library analysis

| | Community-acquired | Healthcare-associated | Hospital-acquired |
|---|--------------------|-----------------------|-------------------|
| | pneumonia | pneumonia | pneumonia |
| | (n = 64) | (n = 82) | (n = 68) |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 12 (18.8) | 9 (11.0) | 1 (1.5) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2 (3.1) | 6 (7.3) | 4 (5.9) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | | 2 (2.9) |
| <i>Streptococcus</i> species (except <i>S. pneumoniae</i>) | 6 (9.4) | 19 (23.2) | 11 (16.2) |
| <i>Corynebacterium</i> species | 1 (1.6) | 4 (4.9) | 8 (11.8) |
| <i>Gemella</i> species | | 1 (1.2) | |
| <i>Enterococcus</i> species | | | 5 (7.4) |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 12 (18.8) | 14 (17.1) | 6 (8.8) |
| <i>Haemophilus</i> species | | | 1 (1.5) |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | 6 (9.4) | 1 (1.2) | 1 (1.5) |
| <i>Klebsiella</i> species | | 3 (3.7) | 1 (1.5) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | 8 (9.8) | 5 (7.4) |
| <i>Escherichia coli</i> | | 2 (2.4) | 4 (5.9) |
| <i>Enterobacter</i> species | | 1 (1.2) | 1 (1.5) |
| <i>Serratia</i> species | | | 2 (2.9) |
| <i>Neisseria</i> species | 3 (4.7) | 2 (2.4) | 6 (8.8) |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | | | 1 (1.5) |
| <i>Nocardia</i> species | | 1 (1.2) | 1 (1.5) |
| <i>Pasteurella Multocida</i> | 1 (1.6) | | |
| Anaerobic pathogen | 10 (15.6) | 8 (9.8) | 7 (10.3) |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | 11 (17.2) | 1 (1.2) | |
| Unknown | | 2 (2.4) | 3 (4.4) |

文献 1), 2), 16) より引用改編

市中肺炎で 9.4%, 医療介護関連肺炎で 23.2%, 院内肺炎で 16.2% の症例で第一優占菌種として検出された。

3. 細菌叢における口腔レンサ球菌および嫌気性菌群の意義

口腔レンサ球菌に関しては、肺炎の主要な原因菌である肺炎球菌や、膿形成を来す等の特徴を有するストレプトコッカス・アンギノサスグループを除いては、その病原性については十分に理解されていない。われわれの研究結果からは、市中肺炎、医療介護関連肺炎、院内肺炎の多くの症例で口腔レンサ球菌が肺炎病巣における下気道の細菌叢の高い占有菌として検出されており、肺炎の病態や原因として何らかの重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、肺炎病巣から口腔レンサ球菌が検出される因子として、“全身状態不良”と“1年以内の肺炎の既往”とが独立した検出因子として抽出され、誤嚥による下気道での口腔レンサ球菌の増加が肺炎の原因として密接に関与している可能性が示唆されている¹⁷⁾。

また、口腔内の衛生状態と下気道の細菌叢についての検討では、口腔衛生状態が不良な患者では、下

気道の細菌叢での口腔内レンサ球菌・嫌気性菌の割合が有意に高かった。既報においても舌細菌叢の違いは肺炎の予後に影響を及ぼす可能性が報告されている¹⁸⁾が、われわれの同一患者における舌細菌叢と下気道の細菌叢との比較のデータからも、舌細菌叢が下気道細菌叢に影響を及ぼしている可能性が示唆される結果となっている。

4. 気腫性変化と細菌叢との関係

細菌性肺炎患者 177 例を対象として、Goddard 分類を用いて気腫性病変の状態を 4 段階に分類し、胸部 CT における気腫性変化の程度と肺炎病巣における細菌叢の違いについて検討を行った¹⁹⁾。細菌叢解析法では、モラクセラ・カタラーリスが、中等度以上の気腫で 8.1% を占め、気腫なし/軽症群の 1.8% と比較し、有意に高い検出頻度を示した ($p = 0.016$)。いっぽうで、COPD でしばしば検出されるインフルエンザ菌や緑膿菌に関しては、細菌叢解析では気腫性変化と下気道の細菌叢に有意な違いはみられなかった。

5. 培養法における薬剤耐性菌検出の意義

気道検体から MRSA が培養された肺炎患者 42 症例を対象として、気管支洗浄液の細菌叢解析の結果

を比較検討した⁴⁾。その結果、この42症例のうち抗MRSA薬を必要とせずに肺炎の改善を認めた28例に注目すると、23例(82%)では黄色ブドウ球菌以外の菌種が最優占菌種として検出され、さらに、このうち16例(57%)では黄色ブドウ球菌はまったく検出されなかった。この結果から、MRSAが培養で検出された肺炎症例の過半数の症例ではそもそも肺炎の病巣には黄色ブドウ球菌が存在しないか非常にminor populationであることとなり、培養によるMRSAの検出自体が鋭敏すぎる可能性が示唆された。

おわりに

現在、肺炎診療においては、原因菌検索においてさまざまな評価法が使用可能となっており、これらの評価法を組み合わせることで、原因菌のより正確な判断が可能となることが望まれる。また、16S rRNA 遺伝子を用いた遺伝子学的手法に関しては、現状では実臨床への応用に関しては難しい側面があるものの、培養法や血清学的検査法などと効率的に組み合わせることによって、培養法によって検出された菌種が単なる検出菌であるのか、真の感染症の原因菌であるのかについて明らかになることが期待される。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文献

- 1) Yamasaki K, Kawanami T, Yatera K, Fukuda K, Noguchi S, Nagata S, et al: Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. *PLoS One* 2013; 8: e63103
- 2) Noguchi S, Mukae H, Kawanami T, Yamasaki K, Fukuda K, Akata K, et al: Bacteriological assessment of healthcare-associated pneumonia using a clone library analysis. *PLoS One* 2015; 10: e0124697
- 3) Putot A, Tetu J, Perrin S, Bailly H, Piroth L, Besancenot J F, et al: Impact of microbiological samples in the hospital management of community-acquired, nursing home-acquired and hospital-acquired pneumonia in older patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35: 489-95
- 4) Kawanami T, Yatera K, Yamasaki K, Noguchi S, Fukuda K, Akata K, et al: Clinical impact of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* on bacterial pneumonia: cultivation and 16S ribosomal RNA gene analysis of bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 155
- 5) Miyashita N, Kawai Y, Tanaka T, Akaike H, Teranishi H, Wakabayashi T, et al: Diagnostic sensitivity of a rapid antigen test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*: Comparison with real-time PCR. *J Infect Chemother* 2015; 21: 473-5
- 6) 日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン 2017 作成委員会 編, 成人肺炎診療ガイドライン 2017, 日本呼吸器学会, 東京, 2017; 13-6
- 7) Mukae H, Yatera K, Noguchi S, Kawanami T, Yamasaki K, Tokuyama S, et al: Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigens in the sputum of pneumonia patients with positive *S. pneumoniae* urinary antigens. *J Infect Chemother* 2015; 21: 176-81
- 8) Ishiguro N, Koseki N, Kaiho M, Kikuta H, Toghashi T, Watanabe T, et al: Sensitivity and Specificity of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of *Mycoplasma Pneumonia* from Nasopharyngeal Swab Samples Compared with those of Real-time PCR. *Clin Lab* 2015; 61: 603-6
- 9) Harris K A, Hartley J C: Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol* 2003; 52: 685-91
- 10) Woo P C, Lau S K, Teng J L, Tse H, Yuen K Y: Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 908-34
- 11) Fredricks D N, Fiedler T L, Marrazzo J M: Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1899-911
- 12) Harris J K, De Groote M A, Sagel S D, Zemanick E T, Kapsner R, Penvari C, et al: Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; 104: 20529-33
- 13) Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M: Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH* 2016; 38: 223-32
- 14) Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D: A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 330-9
- 15) Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral J P, Raoult D: 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3623-30
- 16) Yatera K, Noguchi S, Yamasaki K, Kawanami T, Fukuda K, Naito K, et al: Determining the Possible Etiology of Hospital-Acquired Pneumonia Using a Clone Library Analysis in Japan. *Tohoku J Exp Med* 2017; 242: 9-17
- 17) Akata K, Yatera K, Yamasaki K, Kawanami T,

- Naito K, Noguchi S, et al: The significance of oral streptococci in patients with pneumonia with risk factors for aspiration: the bacterial floral analysis of 16S ribosomal RNA gene using bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Pulm Med* 2016; 16: 79
- 18) Kageyama S, Takeshita T, Furuta M, Tomioka M, Asakawa M, Suma S, et al: Relationships of variations in the tongue microbiota and pneumonia mortality in nursing home residents. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017
- 19) Naito K, Yamasaki K, Yatera K, Akata K, Noguchi S, Kawanami T, et al: Bacteriological incidence in pneumonia patients with pulmonary emphysema: a bacterial floral analysis using the 16S ribosomal RNA gene in bronchoalveolar lavage fluid. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2017; 12: 2111-20

Prognosis of diagnostic methods for the causative bacteria of pneumonia

Shingo Noguchi¹⁾ and Hiroshi Mukae²⁾

¹⁾ Department of Respiratory Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishiku, Kitakyusyu city, Fukuoka, Japan

²⁾ Department of Respiratory Medicine, Unit of Translational Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

Accurate information on the causative bacteria of pneumonia is an important consideration in clinical practice; however, it is difficult to judge whether or not a specific bacterium is among the true causative bacteria based on the ordinary sputum culture methods that are typically employed. Along with the development of rapid diagnostic methods for causative bacteria, antigen detection using immunochromatography and genetic testing are also conducted and covered by the insurance system; however, the advantages of these methods are restricted to specific bacterial species. On the other hand, in recent years, the microbiota of the lower respiratory tract of patients with respiratory diseases can now be investigated due to the emergence of next generation sequencing technology, which has facilitated the analysis of large numbers of base sequences within a short amount of time. In our facility, we examined the bacterial flora in the bronchial lavage fluid of patients with community acquired pneumonia, healthcare-associated pneumonia, and hospital acquired pneumonia using a combination of Sanger sequencing and the clone library method. In addition to the commonly-recognized causative bacteria, our investigation revealed that oral streptococci and anaerobic bacteria play a more important role than previously reported. In addition, we clarified that oral streptococci are often detected in elderly patients with poor general condition. We investigated whether MRSA and *Pseudomonas aeruginosa* (multidrug resistant bacteria) are causative organisms or not; however, we demonstrated that the importance of these bacteria might be overestimated as causative bacteria are detected by culture methods.