

【原著・基礎】

ヒト唾液由来 β -lactam 系薬耐性嫌気性菌の検出

木下 智¹⁾・岩井 理恵¹⁾・松本 康宏¹⁾・前田 健生¹⁾・吉川 一志²⁾・松本 和浩¹⁾
田伏 信¹⁾・村田 雄一¹⁾・篠田 豊¹⁾・井関 富雄¹⁾・尾上 孝利³⁾・森田 章介¹⁾

¹⁾大阪歯科大学口腔外科学第1講座*

²⁾大阪歯科大学歯科保存学講座

³⁾大成学院大学人間学部

(平成17年7月4日受付・平成17年7月27日受理)

ヒト唾液中 β -lactam 薬耐性菌について検討した。成人男性12名より安静時唾液を採取し、ampicillin (ABPC), cefaclor (CCL) および ceftem (CFTM) 加寒天培地に塗抹した。嫌気培養にて発育したコロニーを薬剤選択菌とし、それらの菌種同定、 β -lactamase 産生性および ABPC, ceftem (CEZ), CCL, CFTM の MIC を測定した。ABPC 選択菌 39 株, CCL 選択菌 45 株および CFTM 選択菌 46 株のうち、 β -lactamase 産生菌はそれぞれ 21, 2 および 3 株であった。ABPC 選択菌としては通性嫌気性グラム陽性桿菌が最も多く、次いで偏性嫌気性グラム陰性桿菌であった。CCL 選択菌では通性嫌気性グラム陽性球菌, 通性嫌気性グラム陽性桿菌の順, CFTM 選択菌では通性嫌気性グラム陽性桿菌, 通性嫌気性グラム陽性球菌の順に多かった。ABPC 選択菌と CFTM 選択菌に対する MIC₈₀ は各薬剤で 64 ~ > 256 μ g/mL, CCL 選択菌に対しては ABPC で 16 μ g/mL, その他の薬剤で 256 μ g/mL であった。ABPC では β -lactamase 産生・penicillin および cephem 系耐性菌が, CCL では β -lactamase 非産生・cephem 系耐性菌が, CFTM では β -lactamase 非産生・penicillin と cephem 系耐性菌がそれぞれ得られた。薬剤での選択で供試菌を採取する際には、使用薬剤により得られる菌種や耐性傾向および耐性機構が異なることを考慮すべきであることが示唆された。

Key words: oral bacterial flora, β -lactams, β -lactams resistance, antibiotic selected strain

歯性感染症は内因感染であり、その発症や増悪には口腔内の嫌気性菌が深く関与している¹⁾。歯性感染症の治療には抗菌薬が用いられるが、その中でも β -lactam 薬は強い抗菌力や副作用が少ないなどの特徴から頻用される²⁾。一方、 β -lactam 薬の使用に伴い、これらの薬剤に耐性を示す細菌も検出され^{1,3)}、これら耐性菌の存在はしばしば感染症を難治化させる。

細菌の薬剤耐性の獲得には酵素による薬剤の不活化、作用点の低感受性、薬物の細胞内蓄積の阻害などのさまざまな耐性機構が存在する⁴⁾。口腔の嫌気性菌の β -lactam 薬耐性については β -lactamase 産生の *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) において研究され⁵⁻⁷⁾、分子生物学的側面的一端が明らかにされている^{5,7)}。 β -lactamase 以外の耐性機構としていくつかの仮説があるが⁸⁾、外膜透過性障害に関する細胞外膜 porin が解析⁹⁾されているにすぎない。また、*P. intermedia* 以外の菌種においては β -lactamase 産生菌および非産生菌とも解析は進んでいない。したがって歯性感染症における β -lactam 薬耐性メカニズムを解明するために、今後さらに研究を進める必要がある。大宮¹⁰⁾は唾液試料において penicillin G 耐性菌の分布および薬剤感受性を調べるために同薬剤を用い

て選択している。また、木下⁵⁾は唾液試料に cefaclor (CCL) を用いて CCL 耐性嫌気性グラム陰性桿菌を分離し、 β -lactamase 産生性とプラスミドの有無などについて調査している。このように供試菌としての β -lactam 薬耐性菌を効率的に採取するために、試料から細菌を分離する際に薬剤による選択が行われることがある。しかし、 β -lactam 薬耐性菌を得るための PCG や CCL の使用根拠は示されていない。 β -lactam 薬耐性機構を解明するためにはさまざまな機構を有する種々の耐性菌が必要であるが、それぞれの耐性菌を採取する際にどの薬剤が効果的であるかは不明である。

本研究では、各種 β -lactam 薬による耐性菌選択時の分離菌種および保有耐性機構の差違について調べた。

I. 材料と方法

1. 試料の採取

本研究の主旨を説明し同意を得、4週間、抗菌薬を含め薬剤が投与されていない成人男性ボランティア12名(33~64歳、平均43.9歳)から安静時唾液を滅菌試験管に約1mL採取した。そのうち100 μ Lをただちに生理食塩液にて10⁻¹⁰まで10倍連続希釈した。それぞれの希釈液100 μ Lを、あらかじめ作製したCDC処方嫌気性菌用

Table 1. Selected ratio (%) of drug resistance due to ABPC, CCL, and CFTM

Drug	Case												Average
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
ABPC	0.8×10^{-2}	0.1×10^{-2}	0.2×10^{-2}	0.3×10^{-4}	0	0.8×10^{-1}	0.7	12.0	3.4	0.2×10^{-1}	0.1×10^{-1}	1.7	1.5
CCL	1.4	10.8	1.4	0.3	43.8	18.9	50.7	82.5	14.3	27.6	13.1	91.7	29.7
CFTM	0.3	7.3	97.4	0.5	15.5	5.5	20.4	12.0	41.0	94.1	46.5	41.7	31.9

血液寒天培地¹¹⁾(以下,血液寒天培地)と ampicillin (ABPC,和光純薬,大阪)100 μ g/mL, CCL (塩野義製薬,大阪)100 μ g/mL, および ceftam (CFTM, 富山化学, 富山)100 μ g/mL 加血液寒天培地(以下,選択培地)に塗抹し,アネロパックケンキ(三菱ガス化学,東京)システムにて37, 3日間嫌気培養した。培養後,各平板に発育したコロニー数を計測し,血液寒天培地から総菌数を,そして各選択培地からそれぞれの薬剤選択菌数を求めた。耐性菌選択率は,各薬剤選択菌数(CFU/mL)/総菌数(CFU/mL) \times 100とし,パーセント(%)で表した。選択培地上でコロニー形態の異なる1~4個を新しい培地に再塗抹し,供試菌とした。

2. 菌種の同定

供試菌をグラム染色性および酸素感受性試験(供試菌を血液寒天培地に塗抹し,37, 48時間好気培養にて発育した株を通性嫌気性と判定)により分類した後, Api20A (Biomérieux, France)を用いて生化学的に同定した。

3. β -lactamase 産生性

β -lactamase 産生性は nitrocefin 法¹⁾で行った。hemin, L-cystine, vitamin K₁ および 5% yeast extract (Difco, USA)添加 tryptic soy broth (Difco, 以下 TSB)に発育した菌液に nitrocefin (Oxoid, England)を滴下し,赤変したものを陽性と判定した。

4. MIC の測定

供試菌に対する各薬剤の MIC を日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法¹²⁾に準じ,TSBを用いて薬剤濃度 0.25~256 μ g/mL の 11段階で測定した。薬剤は ABPC, cefazolin (CEZ,和光純薬),CCL および CFTM を用いた。

II. 結 果

1. 耐性菌選択率,分離細菌の分類および同定

唾液試料中の総菌数は $4.0 \times 10^7 \sim 5.3 \times 10^{10}$ CFU/mL であった。薬剤選択菌の発育は ABPC では 11例で,CCL と CFTM では全例でみられた。各薬剤による耐性菌選択率の平均は ABPC 1.5%,CCL 29.7% および CFTM 31.9% であった (Table 1)。供試菌として,各薬剤による選択菌を ABPC 39株,CCL 45株および CFTM 46株,合計 130株採取した。

供試菌をグラム染色性と酸素感受性により分類すると,ABPC 選択菌では通性嫌気性グラム陽性桿菌 (facultative anaerobic Gram-positive rod,以下 FGPR)の割合が

最も高く 41.0%,次いで偏性嫌気性グラム陰性桿菌 (obligate anaerobic Gram-negative rod,以下 OGNR)と通性嫌気性グラム陽性球菌 (facultative anaerobic Gram-positive cocci,以下 FGPC)が各 20.5%,偏性嫌気性グラム陽性球菌が 15.4%,そして偏性嫌気性グラム陽性桿菌が 2.6% であった。CCL 選択菌では FGPC 60%,FGPR 22.2%,OGNR と OGPC が各 8.9%,CFTM 選択菌では FGPR 43.5%,FGPC 30.4%,OGNR 15.2%,通性嫌気性グラム陰性桿菌 (facultative anaerobic Gram-negative rod,以下 FGNR)10.9% であった (Table 2)。

3種の選択菌を合わせた全供試菌 130株中の同定株数は, *Actinomyces israelii* が 43株 (33.1%)と最も高く,次いで *Gemella morbillorum* 10株 (7.7%), *Streptococcus intermedius* 9株 (6.9%), *P. intermedia* 7株 (5.4%), *Prevotella melaninogenica* 6株 (4.6%) の順であった (Table 2)。

2. β -lactamase 産生性

β -lactamase 産生菌の分離率は ABPC 選択菌で 39株中 21株 (53.8%),CCL 選択菌で 45株中 2株 (4.4%) および CFTM 選択菌で 46株中 3株 (6.5%) であった。

3. MIC

ABPC 選択菌に対する MIC は ABPC 0.5~256, CEZ 1~>256, CCL 32~>256 および CFTM 2~>256 μ g/mL に分布しており, MIC₅₀ はそれぞれ 256, 64, >256 および >256 μ g/mL であった (Table 3)。CCL 選択菌に対しては全薬剤で 0.25~>256 μ g/mL に分布し, MIC₅₀ は ABPC 16, CEZ 256, CCL 256 および CFTM 256 μ g/mL であった。CFTM 選択菌に対する MIC は ABPC 0.25~>256, CEZ 0.25~>256, CCL 2~>256 および CFTM 8~>256 μ g/mL に分布し, MIC₅₀ はそれぞれ >256, 64, >256 および >256 μ g/mL であった (Table 3)。

β -lactamase 産生株が多く存在した ABPC 選択菌では, β -lactamase 産生株は ABPC 0.5~256, CEZ 1~>256, CCL 32~>256 および CFTM 2~>256 μ g/mL と全 ABPC 選択菌と同様の範囲に分布していた (Fig. 1)。

III. 考 察

β -lactam 薬はその分子構造から penicillin, cephem (cephalosporin, cephamycin, oxacephem), penem, carbapenem, monobactam および β -lactamase inhibitor の各系統に分けられる¹³⁾。cephem 系では開発時の年代

Table 2. Number of drug-selected strains and identification

Anaerobic	Species	ABPC ¹⁾	CCL ²⁾	CFTM ³⁾	Total ⁴⁾	
Facultative	Gram-positive rod	16 (41.0%)	10 (22.2%)	20 (43.5%)	46 (35.4%)	
	<i>Actinomyces israelii</i>		14	9	20	43
	<i>Lactobacillus</i> spp.		2			2
	<i>Bifidobacterium</i> spp.			1		1
	Gram-positive cocci	8 (20.5%)	27 (60.0%)	14 (30.4%)	49 (37.7%)	
	<i>Streptococcus intermedius</i>			9		9
	<i>Streptococcus isrolii</i>			1		1
	<i>Streptococcus constellatus</i>				1	1
	<i>Streptococcus</i> spp.		4	4	4	12
	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>				1	1
	<i>Staphylococcus</i> spp.			6	1	7
	<i>Gemella morbillorum</i>			5	5	10
	<i>Gemella</i> spp.			2	1	3
	<i>Clostridium constelatus</i>				1	1
	Unidentified		4			4
Gram-negative rod				5 (10.9%)	5 (3.8%)	
	<i>Capnocytophaga</i> spp.			3	3	
	<i>Enterobacterium</i> spp.			2	2	
Obligate	Gram-positive rod	1 (2.6%)			1 (0.8%)	
	<i>Propionibacterium avidum</i>		1		1	
	Gram-positive cocci	6 (15.4%)	4 (8.9%)		10 (7.7%)	
	<i>Peptococcus niger</i>		3	2		5
	<i>Peptostreptococcus</i> spp.		3	2		5
	Gram-negative rod	8 (20.5%)	4 (8.9%)	7 (15.2%)	19 (14.6%)	
	<i>Prevotella intermedia</i>		5		2	7
	<i>Prevotella melaninogenica</i>		2	1	3	6
	<i>Prevotella</i> spp.			3	1	4
	<i>Bacteroides distasonis</i>		1			1
Unidentified				1	1	
Total ⁴⁾		39	45	46	130	

1) Number of ABPC-selected strains

2) Number of CCL-selected strains

3) Number of CFTM-selected strains

4) Total number of strains

Table 3. MIC distribution and MIC₈₀ of drug-selected strains

Drug	MIC (μ g/mL)												MIC ₈₀ (μ g/mL)
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	> 256	
ABPC-selected strain													
ABPC		2	2		3	1	8	7	7	9			256
CEZ			2	4	2	4	8	9	3		1	6	64
CCL								2		7	20	10	> 256
CFTM				4				1		7	3	24	> 256
CCL-selected strain													
ABPC	17	3	3	5	3	2	3		1			8	16
CEZ	6	4	10	2	8	3	1	1			1	9	256
CCL	1	1	2	1		4	3	6	3	8	7	9	256
CFTM	1	2	2	3	3	5	8	3	1	3	6	8	256
CFTM-selected strain													
ABPC	5	8	14	1	4					1		13	> 256
CEZ	2	4	7	8	6	3	5	1	1		1	8	64
CCL				1	6	3	1	5	8	7	3	12	> 256
CFTM						3	5	6	9	7	2	14	> 256

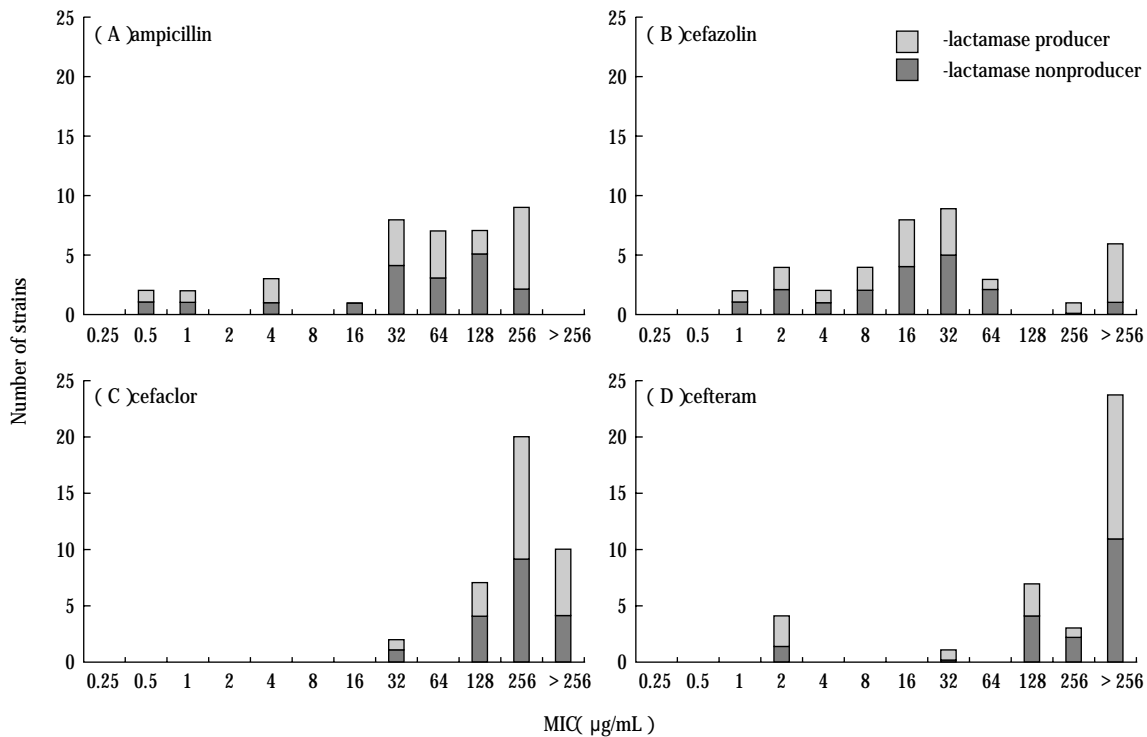


Fig.1. MIC distribution of ABPC-selected strains.

や特徴により第1~3世代に細分類され,さらに近年では第4世代 cephem も登場している¹⁴⁾。本研究では多数の β -lactam 薬のうち,選択する薬剤として penicillin 系の ABPC,第1世代 cephem 系の CCL および第3世代 cephem 系の CFTM を用いた。

耐性菌選択率は各例においてばらつきがあるが,平均値では CCL 29.7%, CFTM 31.9% に対し ABPC 1.5% であり,ABPC は前2者に比べて約 1/20 倍であった。また,CCL と CFTM 選択菌の発育が全例で認められたのに対し,ABPC 選択菌の発育は 12 例中 11 例であり,これらのことは,実際に存在する ABPC 選択菌が CCL および CFTM 選択菌より少なく,採取されにくいことを示している。しかし,本研究の採取方法では,各濃度の希釈液を塗抹した平板を用い,発育コロニーが少ない場合はより高い濃度の希釈液を塗抹した平板から採取でき,また唾液試料を複数名(12名)分用いたことにより,ABPC 選択菌は CCL や CFTM 選択菌と同様の手順にて供試菌として得られることが可能であった。

ABPC 選択菌では分離率の高い順に FGPR, OGNR, CCL 選択菌では FGPC, FGPR, CFTM 選択菌では FGPR, FGPC となっており,各選択薬剤で得られる細菌グループおよび細菌種に差異がみられた。 β -lactamase 産生菌は ABPC で高率に分離され,CCL と CFTM ではその割合が低かった。MIC については ABPC 選択菌と CFTM 選択菌に対する MIC₅₀ は 4 薬剤ともに高値であった。CCL 選択菌では CEZ, CCL および CFTM の MIC₅₀ 値は 256 μ g/mL と高かったが,ABPC では 16 μ g/mL と低

かった。3種の各薬剤選択菌ではそれぞれ分離された細菌種, β -lactamase 産生性, β -lactam 薬耐性傾向が異なっていた。すなわち ABPC などの penicillin 系薬では β -lactamase 産生・penicillin および cephem 系耐性菌が,CCL などの第1世代 cephem 系薬では β -lactamase 非産生・cephem 系耐性菌が,CFTM などの第3世代 cephem 系薬では β -lactamase 非産生・penicillin と cephem 系耐性菌がそれぞれ選択されやすいこと,また細菌グループ別には ABPC では β -lactamase 産生 FGPR や OGNR が,CCL では β -lactamase 非産生 FGPC が,CFTM では β -lactamase 非産生 FGPR がそれぞれ得られやすいことが明らかとなった。各抗菌薬では抗菌活性を示す細菌群が異なる¹⁵⁾。これらの各薬剤の特徴により,得られた各薬剤選択菌の種類や性質に相違が生じたものと考えられた。

以上のことから, β -lactam 薬耐性菌研究において,薬剤での選択で供試菌を採取する際には,使用薬剤により得られる菌種や耐性傾向および耐性機構が異なることを考慮すべきであることが示唆された。

文 献

- 1) 松本和浩:閉鎖性の歯槽膿瘍の細菌学的研究。日口腔外会誌 36: 2016~2034, 1990
- 2) 山本加代子,影向範昭,阪田久美子,他:歯科における抗菌剤の使用傾向 私立歯科大学附属 18 病院における使用実態調査。歯薬物療 18: 84~91, 1999
- 3) 木下 智,尾上孝利,大宮真紀,他:歯性感染症から分離した細菌の β -lactam 薬感受性。日化療会誌 43: 1025~1030, 1995

- 4) 谷口初美：起炎菌の薬剤感受性。戸田新細菌学(吉田真一,柳雄介編),p.140~143,南山堂,東京,2002
- 5) 木下智：歯性感染症における細菌の β -lactam 薬耐性化に関する研究。日化療会誌 44: 136~142, 1996
- 6) 田中裕之：*Prevotella intermedia* β -lactamase の精製と性状。日口腔診断会誌 9: 69~78, 1996
- 7) 松本康宏：口腔由来 *Prevotella intermedia* の β -lactamase 遺伝子に関する研究。歯科医 68: 57~68, 2005
- 8) 山田英夫,尾上孝利：学童期小児の唾液より分離した β -lactam 剤耐性 *Prevotella* の β -lactamase 活性と外膜透過性。歯科医 57: 153~166, 1994
- 9) 杉原圭子：*Prevotella intermedia* 細胞の外膜における porin の精製。歯科医 60: 131~140, 1997
- 10) 大宮真紀：学童期小児の唾液中における penicillin G 耐性菌の分布。歯科医 55: 173~187, 1992
- 11) Koneman E W, Allen S D, Dowell Y R Jr, et al: The anaerobic bacteria. *In* Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, p.406~408, J B Lippincott, Philadelphia, 1988
- 12) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告：微量液体希釈による MIC 測定法(微量液体希釈法) 日本化学療法学会標準法。日化療会誌 38: 102~105, 1990
- 13) 田中信男,中村昭四郎： β -lactam 系抗生物質。抗生物質大要, p.31~61, 東京大学出版会, 東京, 1992
- 14) 鈴木由美子,西成千里,遠藤晴美,他：新鮮臨床分離株に対するカルバペネム薬及び第4世代セフェム薬の抗菌活性。Jpn J Antibiot 54: 473~490, 2001
- 15) 品川長夫：外科常用抗菌薬。抗菌薬の選択と使い方, p.10~19, 医薬ジャーナル社, 東京, 2002

Detection of β -lactams resistant anaerobic bacteria from human saliva

Satoshi Kinoshita¹, Rie Iwai¹, Yasuhiro Matsumoto¹, Takeo Maeda¹,
Kazushi Yoshikawa², Kazuhiro Matsumoto¹, Makoto Tabushi¹, Yuichi Murata¹,
Yutaka Shinoda¹, Tomio Iseki¹, Takatoshi Onoe³ and Shosuke Morita¹

¹First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka Dental University,
8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata, Osaka, Japan

²Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University

³Faculty of Human Studies, Taisei Gakuin University

We examined the β -lactams-resistant bacteria in human saliva. Saliva was gathered from adult men at rest and dropped on to agar plates containing ampicillin(ABPC), cefaclor(CCL), or ceftam(CFTM). Colony, growing anaerobic cultured and drug-selected bacteria were examined for identification, β -lactamase productivity, and ABPC, cefazolin(CEZ), CCL, and CFTM MICs. In 12 cases, ABPC, CCL, or CFTM-selected bacteria were gathered for 39, 45, or 46 strains, and β -lactamase producers were 21, 2, or 3 strains each. Facultative anaerobic Gram-positive rods were the most frequent bacteria in ABPC selected, followed by obligate anaerobic Gram-negative rods. Facultative anaerobic Gram-positive cocci were the most frequent bacteria followed by facultative anaerobic Gram-negative rods in CCL selected. Facultative anaerobic Gram-positive rods were the most frequent, followed by facultative anaerobic Gram-negative cocci in CFTM selected. MIC₅₀ of each of the 4 drugs against ABPC or CFTM-selected bacteria were distributed from 64 to > 256 μ g/mL, and ABPC was 16 μ g/mL and the remaining 3 drugs were 256 μ g/mL against CCL selected. β -Lactamase producers, and penicillins and cepheims-resistant strains were selected by ABPC, β -lactamase nonproducers, and cepheims-resistant strains were selected by CCL, and β -lactamase nonproducers, and penicillins and cepheims-resistant strains were selected by CFTM. When we select the drug-resistant bacteria using by drugs, we have to take care that, various bacterial species, resistant trend, and resistant mechanism, caused by using various drugs.