

# 歯性感染症から分離した *Prevotella intermedia* の $\beta$ -lactam 薬感受性と $\beta$ -lactamase 活性

木下 智<sup>1)</sup>・尾上 孝利<sup>2)</sup>・大宮 真紀<sup>3)</sup>・杉原 圭子<sup>3)</sup>・松本 和浩<sup>1)</sup>  
多々見敏章<sup>1)</sup>・栗林 信仁<sup>1)</sup>・山本 憲二<sup>1)</sup>・村田 雄一<sup>1)</sup>・石川 英雄<sup>1)</sup>  
糸永雄二郎<sup>2)</sup>・佐川 寛典<sup>2)</sup>・白敷 力也<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 大阪歯科大学口腔外科学第1講座\*

<sup>2)</sup> 同 細菌学講座, <sup>3)</sup> 同 臨床歯科学研究所

(平成7年8月21日受付・平成7年10月11日受理)

歯性感染症における  $\beta$ -lactam 薬耐性機構を解析するため、閉鎖性膿瘍や蜂窩織炎などから優位に分離される *Prevotella intermedia* を用いて最小発育阻止濃度 (MIC) と  $\beta$ -lactamase 活性を測定し、 $\beta$ -lactam 薬耐性に果たす  $\beta$ -lactamase の役割を検討した。根管起因の閉鎖性膿瘍患者の内容液より分離した細菌のうち生化学的性状試験とマイクロプレートハイブリダイゼーション法の結果を用いて *P. intermedia* と同定した 169 株 (症例 A: 52 株, B: 35 株, C: 82 株) を実験に供試した。MIC<sub>90</sub> を症例ごとに比較すると症例 A および C では ampicillin (ABPC) と cefaclor の値が大きく 100~200  $\mu$ g/ml, ついで latamoxef, ceftizoxime および ceftoram の順に値が大きく, cefmetazole と imipenem の値は  $\beta$ -lactam 薬以外の薬剤と同様に小さかった。症例 B の MIC<sub>90</sub> は症例 A と C より小さかった。 $\beta$ -lactamase 活性は各症例により異なり、症例 A では基質 ABPC および基質 cefazolin (CEZ) の両分解活性が高く、症例 C では基質 CEZ の分解活性が高く、基質 ABPC の分解活性は低く、症例 B では両分解活性がともに低かった。供試菌株由来  $\beta$ -lactamase は基質 CEZ のみを分解する場合および基質 ABPC と基質 CEZ をともに分解する場合が多数を占めていた。 $\beta$ -Lactamase 活性と  $\beta$ -lactam 薬の MIC との関係を検討した結果、 $\beta$ -lactamase 活性が高い菌株の多くは MIC も大きい値を示した。しかし、 $\beta$ -lactamase 活性が低い MIC が大きい菌株も一部でみられた。以上の事実は、歯性感染症から分離される *P. intermedia* の  $\beta$ -lactam 薬耐性機構には基質 CEZ の分解活性の高い  $\beta$ -lactamase が深く関与することを示唆しているが、それ以外の耐性機構の存在も検討する必要があると考えられる。

**Key words:** odontogenic infection, *Prevotella intermedia*, susceptibility of  $\beta$ -lactams,  $\beta$ -lactamase activity

*Prevotella intermedia* は重度の閉鎖性膿瘍や蜂窩織炎などの症例から分離頻度がとくに高く<sup>1-3)</sup>、本菌がこれら感染症の発症と進展に重要な役割を果たすことが示唆され、病原酵素産生性<sup>2,3)</sup>、粘性物質産生性<sup>2)</sup> および付着因子としての線毛の性状<sup>4,5)</sup> が検討されている。

*P. intermedia* のほとんどの菌株は  $\beta$ -lactam 薬に感受性を示すが、一部の菌株は耐性を示す<sup>1)</sup>。 $\beta$ -lactam 薬耐性機構には、一般的に  $\beta$ -lactamase による薬剤の加水分解<sup>6)</sup>、外膜透過性の障害<sup>6,7)</sup> および penicillin binding protein (PBP) の親和性の変化<sup>6)</sup> が単独あるいは複合して関与する<sup>6,8,9)</sup> と考えられている。これまでに  $\beta$ -lactam 薬耐性 *P. intermedia* が口腔から分離され、MIC 値と  $\beta$ -lactamase 活性が比較的良好に一致することが明らかにされている<sup>8,10)</sup>。歯性感染症発症原因の 1 つとして、常在菌の耐性化の可能性が推定され<sup>11)</sup>、個々の症例における細菌の薬剤感受性や耐性化の動向を把握することが、治療上重要であると考えられる。ところが、これまでに主要構成菌に着目しながら、症例ごとに耐性化の動向を検討した報告はみられない。

本研究では、歯性感染症における  $\beta$ -lactam 薬耐性機構を症例間で比較するため、閉鎖性膿瘍内容物より細菌を分離・同定し、*P. intermedia* が優位に分離された症例を用いて MIC と  $\beta$ -lactamase 活性を調べた。

## I. 材料と方法

### 1. 対象症例

前報<sup>12)</sup> に示した *P. intermedia* が優位に分離された 3 症例 (症例 A, B および C) を対象とした。

### 2. 試料の採取、細菌の分離および同定

試料の採取、希釈、培養および分離は松本<sup>1)</sup>の方法に従った。

分離した黒色色素産生性グラム陰性桿菌と標準菌株の *P. intermedia* ATCC 25611 と ATCC 33563 間の DNA 相同値をマイクロプレートハイブリダイゼーション法<sup>13,14)</sup> で求めた。ついで、Johnson<sup>15)</sup> の判定基準により、*P. intermedia* 標準菌株との相同性値がもっとも高く、2 番目に高い菌種の値との相対類似度が 70 % 以下の菌株を *P. intermedia* として同定した結果、症例

A: 52 株, B: 35 株および C: 82 株を得, 実験に供した。

### 3. 最小発育阻止濃度の測定

*P. intermedia* に対する各種抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) は, 前報<sup>12)</sup> に従って測定した。

### 4. $\beta$ -Lactamase 活性

*P. intermedia*  $\beta$ -lactamase 活性は ampicillin (ABPC) および cefazolin (CEZ) を基質としてマイクロヨード法<sup>10,16)</sup> で測定した。通法<sup>10)</sup> により供試菌から超音波破碎で得た粗酵素液を, あらかじめ調整された基質と反応させた後, タングステン酸ナトリウムにより反応を停止させヨウ素デンプン溶液を加え一定時間後, 波長 595 nm における吸光度を測定した。酵素活性は以下の式に従ってタンパク 1 mg あたりの活性で示した。

$\beta$ -lactamase 活性 (Unit/mg)

$$= \Delta A \times 0.09/F \times 1/15 \times 1/0.1 \times 1/P$$

$$\Delta A = A \text{ blank} - A \text{ sample}$$

F<sup>16)</sup>: ABPC: 3.89, CEZ: 5.02

P: 粗酵素 1 ml 中のタンパク質量 (mg)

## II. 結 果

### 1. MIC

$\beta$ -Lactam 薬の MIC<sub>90</sub> は, 症例 A, B および C でそれぞれ ABPC では 100,  $\leq 0.39$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , cefaclor (CCL) では 200, 6.25,  $> 200 \mu\text{g/ml}$ , cefmetazole (CMZ) では 1.56, 0.78, 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , latamoxef (LMOX) では 25, 0.78, 3.13  $\mu\text{g/ml}$ , ceftizoxime (CZX) では 1.56,  $\leq 0.39$ , 6.25  $\mu\text{g/ml}$ , ceftoram (CFTM) では 3.13,  $\leq 0.39$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , imipenem (IPM) ではいずれも  $\leq 0.39 \mu\text{g/ml}$  であった。症例 A および C では  $\beta$ -lactam 薬の ABPC と CCL の値が特に大きく 100~200  $\mu\text{g/ml}$ , ついで LMOX, CZX および CFTM の値が大きかった。 $\beta$ -Lactam 薬以外の薬剤の供試菌に対する MIC は, CMZ と IPM の値と同様に小さかった (Table 1)。

### 2. $\beta$ -Lactamase

### 1) 産生性

*P. intermedia* の  $\beta$ -lactamase 産生株の割合は症例 A, B および C でそれぞれ 98.1, 17.2 および 98.8 % であった。このうち基質 ABPC のみを分解する菌株は症例 A, B および C でそれぞれ 0, 8.6 および 0 %, 基質 CEZ のみは同 53.9, 8.6 および 34.1 %, 基質 ABPC と CEZ の両者とも分解する菌株は同 44.2, 0 および 64.6 % であり, CEZ を分解する菌株が多かった。症例 A と C を比べると, 症例 A が症例 C より基質 CEZ のみを分解する菌株の割合が高かった。症例 B の菌株は症例 A, C とは異なり, 基質 ABPC または CEZ のみを分解した (Table 2)。

### 2) 活 性

症例 A, C とともに各菌株由来  $\beta$ -lactamase の ABPC 分解活性は 40 mU/mg 以下であったが, CEZ の分解活性は菌株によってバラツキがみられ 0~ $\geq 100$  mU/mg に分布していた。分布の peak および最大値は症例 A の菌株では 40~50 および 141 mU/mg, 症例 C の菌株では 70~80 および 123 mU/mg であった (Fig. 1)。症例 B では, 基質 ABPC の分解活性が 90~100 および 40~50 mU/mg である  $\beta$ -lactamase 産生株が各々 1 株ずつ観察された (Fig. 1)。

### 3) MIC と $\beta$ -lactamase 活性の関係

各菌株の MIC と  $\beta$ -lactamase 活性の関係を, ABPC の MIC と基質 ABPC の加水分解活性および CCL の MIC と基質 CEZ の加水分解活性の間で検討した。症例 A では基質 ABPC および CEZ に対する供試菌の  $\beta$ -lactamase 活性が高い場合, この菌株に対する ABPC と CCL の MIC は大きかった。しかし, CEZ に対する加水分解活性が認められるにもかかわらず, MIC が  $\leq 0.39 \mu\text{g/ml}$  の菌株が 2 株観察された。症例 B では MIC が小さく, 両基質に対する  $\beta$ -lactamase 活性も低い菌株 (ABPC の耐性限界値 MIC 12.5  $\mu\text{g/ml}$  未満, CCL の耐性限界値 MIC 50  $\mu\text{g/ml}$  未満, 両酵素活性 30

Table 1. Susceptibility of isolates of *Prevotella intermedia* to various antibiotics

Case (Number of isolates)	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )										
	ABPC	CCL	CMZ	LMOX	CZX	CFTM	IPM	OFLX	MINO	EM	CLDM
A (52)	100	200	1.56	25	1.56	3.13	$\leq 0.39$	1.56	1.56	0.78	$\leq 0.39$
B (35)	$\leq 0.39$	6.25	0.78	0.78	$\leq 0.39$	$\leq 0.39$	$\leq 0.39$	3.13	$\leq 0.39$	$\leq 0.39$	$\leq 0.39$
C (82)	100	$> 200$	0.78	3.13	6.25	50	$\leq 0.39$	0.78	6.25	$\leq 0.39$	$\leq 0.39$

ABPC: ampicillin, CCL: cefaclor, CMZ: cefmetazole, LMOX: latamoxef, CZX: ceftizoxime, CFTM: ceftoram, IPM: imipenem, OFLX: ofloxacin, MINO: minocycline, EM: erythromycin, CLDM: clindamycin

Table 2. Percent of  $\beta$ -lactamase producers hydrolyzing ampicillin and cefazolin

Case	Percent of $\beta$ -lactamase producers			no hydrolysis
	only ABPC	only CEZ	both ABPC and CEZ	
A	0	53.9	44.2	1.9
B	8.6	8.6	0	82.8
C	0	34.2	64.6	1.2

ABPC: ampicillin, CEZ: cefazolin

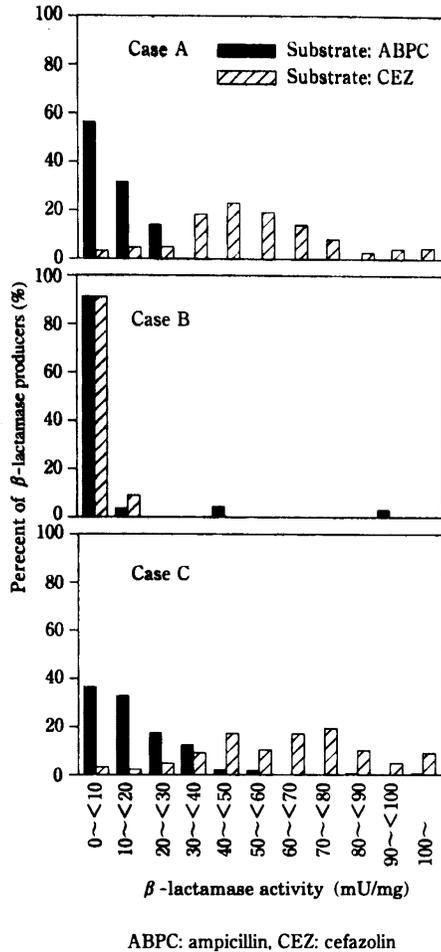


Fig. 1. Distribution of  $\beta$ -lactamase producer.

mU/mg 未満)が多かったが、酵素活性は 45~91 mU/mg と高い値を示すが、ABPC の MIC は  $\leq 0.39 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$  と低い値を示す菌株も分離された。症例 C では症例 A とは異なり、基質 ABPC と基質 CEZ に対する供試菌の  $\beta$ -lactamase 活性はともに大きいバラツキがみられた。ABPC の MIC は高いが、基質 ABPC に対する  $\beta$ -lactamase 活性は低い菌株 (MIC  $12.5 \mu\text{g/ml}$  以上、酵素活性 30 mU/mg 未満) が 47 株みられた。CCL の場合、MIC が高く基質 CEZ に対する  $\beta$ -lactamase 活性も高い菌株 (MIC  $50 \mu\text{g/ml}$  以上、酵素活性 30 mU/mg 以上) が多いものの、MIC が低いにもかかわらず  $\beta$ -lactamase 活性が高い菌株 (MIC  $50 \mu\text{g/ml}$  未満、酵素活性 30 mU/mg 以上) が 15 株認められた (Fig. 2)。

III. 考 察

我が国の医科および歯科領域における感染症治療および予防に際し、抗菌薬は予防効果を高めるために広域スペクトルを持つものが頻りに、多量に投与されている。これら薬剤の投与によって常在菌叢も影響を受け、感受性が低くなり耐性菌が選択されたり、突然変異による耐性菌の出現などに脅かされている<sup>13)</sup>。特に、常在菌によ

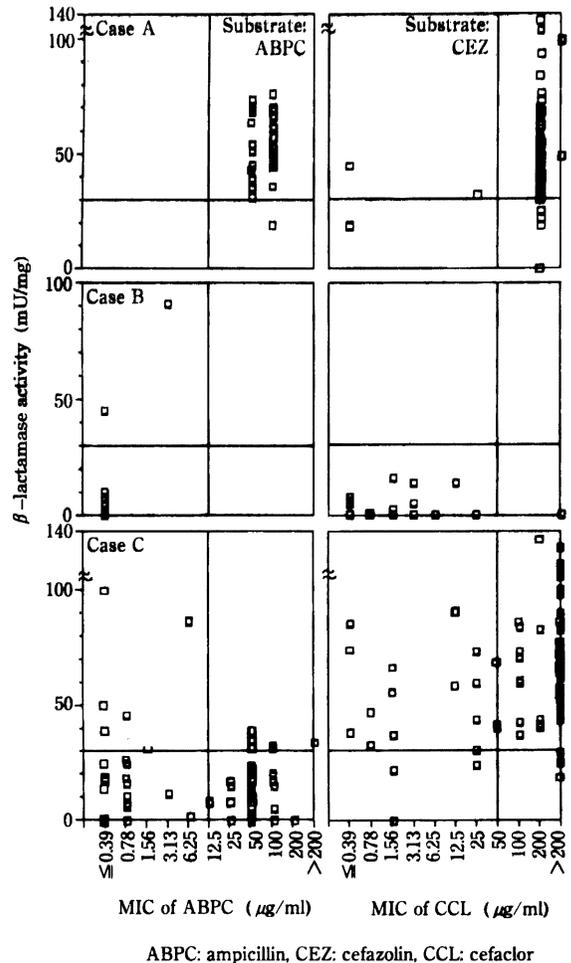


Fig. 2. Relation between  $\beta$ -lactamase activity and the MIC of ampicillin and cefaclor.

る内因感染である菌性感染症の治療に際してはこれらの事実を正確に把握していなければならない。菌性感染症では、耐性菌出現頻度、耐性値、 $\beta$ -lactamase 産生菌の分布頻度および主要構成菌の分布割合は症例によって著しく異なっており<sup>1,2,12)</sup>、抗菌薬を一律に投与することはできない。前報<sup>12)</sup>で述べたように、口腔領域の感染症である閉鎖性膿瘍内容物から細菌を分離後同定すると主要構成菌の割合は症例ごとに異なっていた。骨膜下膿瘍や蜂窩織炎および辺縁性菌周炎の急性期に頻りに分離される<sup>1-3,17)</sup> *P. intermedia* を優位 (60%以上) とする症例に注目して薬剤感受性と  $\beta$ -lactam 薬耐性菌の分布状況を比較したところ、症例間で両者は大きく異なっていた。すなわち、薬剤感受性は 3 症例中 2 症例で  $\beta$ -lactam 薬の ABPC と CCL の感受性が著しく低く、ついで LMOX と CFTM に対する感受性も低かった。しかし、CMZ, CZX および IPM の感受性は高く、これらの症例では ABPC, CCL, LMOX および CFTM の投与は困難と考えられるが、CMZ, CZX, IPM およびその他供試抗菌薬ではいずれも MIC<sub>90</sub>は小さく、治療に際

し投与可能である。症例 B では ABPC, CCL をはじめ供試した全抗菌薬を投与できる。症例間で MIC と  $\beta$ -lactamase 活性が異なった理由を推定すると、前報<sup>12)</sup>に示したように症例 A, C では  $\beta$ -lactam 薬などの抗菌薬が最近投与され、 $\beta$ -lactamase を産生する耐性菌が選択され、逆に症例 B では抗菌薬が投与されなかったために耐性菌が選択されなかったためと考えられる。

ABPC と CCL に対する MIC が高くなった理由を解析するために、これまで他の菌種<sup>9,18)</sup>で調べている  $\beta$ -lactamase 活性を測定し、MIC との相関性を求めた。症例 A では、 $\beta$ -lactamase 活性と MIC はよく相関し、ABPC と CCL 耐性には  $\beta$ -lactamase が主たる原因であると考えられる。ところが、症例 C では、症例 A と同様に、 $\beta$ -lactamase 活性と MIC が相関する菌株が多くみられるが、相関しない菌株もかなり認められる。この結果は、 $\beta$ -lactamase 以外の耐性機構（外膜透過性の障害あるいは PBP 親和性の相違）がこれら菌株の耐性化に関与している可能性を示している。

本研究に用いた *P. intermedia*  $\beta$ -lactamase は基質 CEZ のみまたは基質 CEZ と ABPC の両者を分解し、基質分解性は症例 A と C では ABPC より CEZ で大きかった。この理由は、セフェム系薬の使用頻度が高いことに関係していると推定される。

本研究に供試した症例 A と C で *P. intermedia* が優位に分離された理由は、 $\beta$ -lactamase を産生し  $\beta$ -lactam 薬を加水分解した結果生き残ったためと考えられる。しかし、症例 B のように  $\beta$ -lactamase 非産生菌株が多く、 $\beta$ -lactam 薬に対しても感受性を示す菌株が多い症例からも優位に分離されるため薬剤耐性が原因とは一概にいえない。

以上の事実は、菌性感染症の治療に際し薬剤を選択する場合、MIC だけでなく耐性機構をも考慮する必要があることを示唆している。

#### 文 献

- 1) 松本和浩: 閉鎖性の菌槽膿瘍の細菌学的研究。日口外誌 36: 2016~2034, 1990
- 2) 寺岡靖之, 福島久典: 骨膜下膿瘍における酵素および粘性物質産生菌の分布。歯科医学 55: 327~336, 1992
- 3) 多々見敏章: 菌性感染症における偏性嫌気性菌の病原因子とくに酵素活性に関する研究。日口外誌 38: 254~270, 1992
- 4) 斉藤尚宏, 尾上孝利: *Bacteroides intermedius* の線毛の性状。歯科医学 53: 288~298, 1990
- 5) Leung K P, Fukushima H, Sagawa H, Walker C B, Clark W B: Surface appendages, hemagglutination, and adherence to human epithelial cells of *Bacteroides intermedius*. Oral microbiol. Immunol. 4: 204~210, 1989
- 6) 澤井哲夫, 平松啓一, 小此木研二, 中江太治:  $\beta$ -lactam 剤耐性。病原菌の薬剤耐性 機構の解明とその対策 (橋本 一, 井上松久編), p.41~79, 学会出版センター, 東京, 1993
- 7) Suginaka H, Ichikawa A, Kotani S: Penicillin-resistant mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: Binding of penicillin to *Pseudomonas aeruginosa* KM 338. Antimicrob. Agents Chemother. 7: 629~635, 1975
- 8) 山田英夫, 尾上孝利: 学童期小児の唾液より分離した  $\beta$ -lactam 剤耐性 *Prevotella* の  $\beta$ -lactamase 活性と外膜透過性。歯科医学 57: 153~166, 1994
- 9) 山本英樹, 尾上孝利: 急性リンパ性白血病患児の唾液由来 penicillin G 耐性 *Capnocytophaga* の薬剤感受性と  $\beta$ -lactamase 活性。歯科医学 57: 217~232, 1994
- 10) 江龍多美子, 尾上孝利: ヒト口腔由来 *Prevotella intermedia* の  $\beta$ -lactamase 活性。歯科医学 56: 309~320, 1993
- 11) 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。歯科医学 55: 173~187, 1992
- 12) 木下 智, 他: 菌性感染症から分離した細菌の  $\beta$ -lactam 薬感受性。日本化学療法学会雑誌 43: 1025~1030, 1995
- 13) Ezaki T, Hashimoto Y, Yamamoto H, Lucida M L, Lui S L, Kusunoki S, Asano K, Yabuuchi E: Evaluation of the microplate hybridization method for rapid identification of *Legionella* species. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis. 9: 213~217, 1990
- 14) 江崎孝行, Shatha A, 三宅正美: 菌種の分類学的類似度を測定する定量的マイクロプレートハイブリダイゼーション法。日細菌誌45: 851~857, 1990
- 15) Johnson J L: Nucleic acids in bacterial classification. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (Krieg N R, Holt J G eds), p 8~11, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984
- 16) 澤井哲夫, 高橋郁子:  $\beta$ -Lactamase 活性測定法とその応用。蛋白質 核酸 酵素 23: 391~400, 1978
- 17) 中垣直毅: 菌周ポケットにおける病原酵素産生菌の分布。歯科医学 56: 497~508, 1993
- 18) 田村 忍, 長岐為一郎, 福田一郎:  $\beta$ -ラクタム剤による緑膿菌の  $\beta$ -lactamase 誘導と薬剤感受性。Chemotherapy 41: 750~754, 1993

## Susceptibility of *Prevotella intermedia* isolated from odontogenic infection to $\beta$ -lactam antibiotics, and $\beta$ -lactamase activity

Satoshi Kinoshita<sup>1)</sup>, Takatoshi Onoe<sup>2)</sup>, Maki Omiya<sup>3)</sup>, Keiko Sugihara<sup>3)</sup>,  
Kazuhiro Matsumoto<sup>1)</sup>, Toshiaki Tatami<sup>1)</sup>, Nobuhito Kuribayashi<sup>1)</sup>,  
Kenji Yamamoto<sup>1)</sup>, Yuichi Murata<sup>1)</sup>, Hideo Ishikawa<sup>1)</sup>, Yujiro Itonaga<sup>2)</sup>,  
Hirosuke Sagawa<sup>2)</sup> and Rikiya Shirasu<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, <sup>2)</sup> Department of Bacteriology, and

<sup>3)</sup> Research Institute for Clinical Dentistry, Osaka Dental University, 1-5-31 Otemae,  
Chuo-ku, Osaka 540, Japan

The MICs of antibiotics against *Prevotella intermedia* which were predominantly isolated from closed abscesses or cellulitis, and  $\beta$ -lactamase activity were measured to determine the role of  $\beta$ -lactamase in  $\beta$ -lactam resistant bacteria originating in odontogenic infections. 169 strains of *P. intermedia* (case A, 52 strains, case B, 35 strains and case C, 82 strains) which were isolated from closed abscesses of endodontic origin were used in this experiment after identification of the microdilution plate hybridization method. In the cases of A and C, the MIC<sub>90</sub> of cefaclor was the largest among the drugs used, and their values became smaller in the order latamoxef, ceftiozime and ceftoram. The MIC<sub>90</sub>s of cefmetazole and imipenem were as small as those of other antibiotics except for  $\beta$ -lactams. The MIC<sub>90</sub> in case B was lower than that in cases A and C.  $\beta$ -Lactamase activity differs with the case. Hydrolysis to substrates ampicillin (ABPC) and cefazolin (CEZ) was high in case A, and low in case B. However, in case C the ability of  $\beta$ -lactamase to hydrolyze substrate CEZ was high, but it was low for substrate ABPC.  $\beta$ -Lactamase chiefly hydrolyzed only substrate CEZ or both substrates ABPC and CEZ. Most of the isolates for which a drug had a higher MIC also had high  $\beta$ -lactamase activity, but in some isolates there was no relationship between the MIC and  $\beta$ -lactamase activity. These results suggest that  $\beta$ -lactamases which strongly hydrolyzed CEZ are closely related to the mechanism of  $\beta$ -lactam resistance in *P. intermedia* isolated from odontogenic infections, but we must also study mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance other than that of  $\beta$ -lactamase.