

菌性感染症における細菌の β -lactam 薬耐性化に関する研究

木下 智

大阪歯科大学口腔外科学第1講座*

(平成7年10月19日受付・平成8年1月10日受理)

内因感染症である菌性感染症における β -lactam 薬耐性菌出現機構を解明するため、口腔常在菌叢における耐性菌の状態と耐性因子の伝達について検討した。口腔常在菌叢の唾液より β -lactam 薬耐性菌を cefaclor (CCL) 32 μ g/ml 添加選択培地にて検索したところ 50 名中 46 名より本耐性嫌気性グラム陰性桿菌が検出された。分離した嫌気性グラム陰性桿菌 91 株は *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia* などの黒色素産生性グラム陰性桿菌が多数を占めていた。分離菌株のうち β -lactamase 産生株は 88 株 (96.7%) で認められた。嫌気性グラム陰性桿菌に対する MIC₉₀ は CCL で > 256 μ g/ml, ampicillin で 256 μ g/ml と大きく、ついで, ceftizoxime, ceftoram が 128 μ g/ml, cefazolin が 64 μ g/ml, latamoxef が 16 μ g/ml であり, cefmetazole および imipenem はそれぞれ 2 および \leq 0.25 μ g/ml と小さかった。菌性感染症由来の β -lactamase 陽性・ β -lactam 薬耐性 *P. intermedia* T5001 を donor, β -lactamase 陰性・ β -lactam 薬感受性の *Bacteroides capillosus* K8085 を recipient として β -lactam 薬耐性因子の伝達を行ったところ, 7.9×10^{-6} の頻度で耐性化した。得られた transconjugants は β -lactamase 陽性で, β -lactam 薬耐性を示した。Donor, recipient および transconjugants から plasmid はともに検出されなかった。以上の事実は, 菌性感染症における β -lactam 薬耐性菌の出現に, 発症以前より口腔に常在する耐性菌の関与および耐性菌から耐性因子が伝達されることによる感受性菌の耐性化の関与を示唆している。この耐性因子は染色体上にあるものと考えられる。

Key words: odontogenic infection, anaerobic gram-negative rod, β -lactam antibiotic resistance, β -lactamase, transfer of β -lactam resistant factor

菌性感染症は根管を通じて根尖部に侵入した口腔常在細菌が, 宿主の抵抗力の減弱により活発化し, 炎症症状を呈する内因感染症である¹⁾。口腔内には streptococci を主とする通性嫌気性グラム陽性球菌をはじめ, 通性嫌気性グラム陽性桿菌の lactobacilli, 嫌気性グラム陽・陰性球菌および桿菌などきわめて多種類の細菌が常在している²⁾。菌性感染症の病巣からも口腔レンサ球菌や嫌気性菌^{3, 4)} など種々の口腔常在細菌が検出される。嫌気培養技術および機器の整った今日では, 嫌気性菌特に嫌気性グラム陰性桿菌の検出率が高く, 閉鎖性膿瘍内溶液からは *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides* が優位に分離されている^{1, 5, 6)}。これら臨床分離嫌気性グラム陰性桿菌中には組織破壊酵素である collagenase や hyaluronidase など種々の病原酵素活性が高い菌株も多く存在し⁶⁾、菌性感染症の発症, 進展および膿瘍形成に深く関与していると考えられている。

菌性感染症の治療としては抗菌薬療法が施行されるが, 投与抗菌薬に対し細菌が耐性化し, 難治性となり, 治療に苦慮することがある。それに対応し, 治療に有効な抗菌薬を選択するために薬剤の感受性^{1, 3-5)}, 組織移行性⁷⁾, 薬動学的検討⁸⁾ および細菌の耐性因子の検索^{1, 5, 6)} が行われている。その

結果, β -lactam 薬耐性の菌株が存在し^{1, 9)}, 不活化酵素の β -lactamase を産生すること^{1, 5, 6)} が報告されている。歯科領域では種々の抗菌薬が使用され, なかでも β -lactam 薬の使用頻度は高い⁹⁾ ため, β -lactam 薬耐性菌の存在は菌性感染症の難治化の一因となりうる。

一般に β -lactam 薬耐性菌の作用機構として, β -lactamase による薬剤の不活化¹⁰⁻¹²⁾, 外膜透過性の障害¹⁰⁻¹²⁾ および penicillin binding protein の親和性の低下^{10, 12)} が単独あるいは複合^{11, 12)} して関与すると考えられている。口腔由来嫌気性グラム陰性桿菌の β -lactam 薬耐性機構については江龍ら¹⁰⁾ の β -lactamase 活性の調査や田中ら¹¹⁾ の β -lactamase 阻害剤を用いた研究で, β -lactamase が深く関与していることが明らかとなっている。さらに山田ら¹⁰⁾ は一部の菌株では外膜透過性障害の関与を指摘している。しかし, 菌性感染症治療時の抗菌薬療法の障害となる β -lactam 薬耐性菌がどのようにして出現し, 耐性を示すかについてはほとんど解析されていない。

本研究では, 菌性感染症における β -lactam 薬耐性菌の出現機構を解明するため, 菌性感染症から優位に分離され, 種々の病原因子を有する嫌気性グラム陰性桿菌について, 口

腔常在菌叢における耐性菌の検出を行い、また、歯性感染症より分離した感受性菌の耐性化について検討した。

I. 方 法

1. 唾液細菌叢中の β -lactam 薬耐性菌の検出

唾液細菌叢中の β -lactam 薬耐性菌の検出は大宮¹⁷⁾の方法を若干変更して行った。本研究の主旨を説明し同意を得た成人ボランティア 50 名より安静時唾液を採取した。ただし、anaero-box (N₂: 80 %, CO₂: 10 %, H₂: 10 %, 平沢製作所, 東京) 内に輸送し, 0.5 ml を 4.5 ml の reduced transport fluid¹⁸⁾ に入れ 10⁻¹⁰ まで 10 倍連続希釈を行った。各希釈液のうち 100 μ l ずつを CDC 処方嫌気性菌用血液寒天培地¹⁹⁾ (血液寒天培地) に 32 μ g/ml cefaclor (CCL, 塩野義製薬) を添加した培地 (CCL 選択培地) に塗抹し, 48 時間嫌気培養した。CCL 添加量は, 成人 41 名の唾液より血液寒天培地で分離した嫌気性グラム陰性桿菌 77 株に対する CCL の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し, その分布より break point を 32 μ g/ml と定め²⁰⁾, この値を用いた。

100 個前後 colony の発育が認められる CCL 選択培地上にて colony 形態, 色調および大きさの差異により 1 人あたり 1~6 個の colony を釣菌した。ついで, グラム染色と 48 時間の好気培養の結果から発育が認められない菌株を CCL 耐性嫌気性グラム陰性桿菌として分離した。

2. 供試菌株の同定

各供試菌株のうち黒色素産生性グラム陰性桿菌 (black pigmented gram-negative rod, BPGNR) は microplate hybridization 法^{21,22)} で各標準菌株との DNA 相同値を求め, Johnson の記載²³⁾ している基準に従って同定した。標準菌株は *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845, *Prevotella corporis* ATCC 33547, *Prevotella denticola* ATCC 33185, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, 33563, *Prevotella loescheii* ATCC 15930, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Porphyromonas asaccharolytica* ATCC 25260, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 33406 および *Escherichia coli* K12 を用いた。BPGNR 以外の菌株は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology²⁴⁾ および Shah ら^{25, 26)} の分類基準に従い, gas chromatography による glucose からの終末代謝産物の検索および各種生化学的性状試験結果から同定した。

3. β -Lactam 薬耐性因子の伝達

β -Lactam 薬耐性因子の伝達は filter mating 法²⁷⁾ にて行った。すなわち, 歯性感染症より分離した β -lactamase 産生・ β -lactam 薬耐性 *P. intermedia* T 5001 株を donor, β -lactamase 非産生・ β -lactam 薬感受性 *Bacteroides capillosus* (黒色素非産生性グラム陰性桿菌) K8085 株を recipient として用いた。

Transconjugants として CCL 100 μ g/ml 添加培地上

で発育した非黒色 colony を選択した。

4. β -Lactamase 産生性および β -lactamase 活性

β -Lactamase 産生性は hemin, L-cystine, vitamin K₁ および 5% yeast extract (DIFCO, USA) 添加 trypticase soy broth (TSB, Becton Dickinson, USA) に発育した菌液に nitrocefin (Oxoid, England) を滴下して調べ, 赤変したものを陽性として判定した⁶⁾。 β -Lactamase 活性は UV 法²⁸⁾ により基質 ampicillin (ABPC, 明治製菓) と CCL を用い, それぞれ波長 235 および 265nm で測定した。

5. MIC の測定

供試菌株に対する各抗菌薬の MIC は日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法²⁹⁾ に準じ, GAM broth (日水製薬, 東京) を用いて薬剤濃度 0.25~256 μ g/ml の 11 段階で測定した。使用抗菌薬は ABPC, cefazolin (CEZ, 藤沢薬品), CCL, cefmetazole (CMZ, 三共), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品), ceftoram (CFTM, 富山化学) および imipenem (IPM, 萬有製薬) の 8 種類で, それぞれ力価の明瞭な原末を各製薬会社より提供を受けて用いた。

6. Plasmid の検索

Plasmid 保有の有無は TSB に発育させた各供試菌液より alkaline extraction 法^{30,31)} で plasmid DNA を抽出し, 0.8% agarose gel 上で電気泳動後, ethidium bromide 染色により確認した。

II. 結 果

1. 唾液中の CCL 耐性嫌気性グラム陰性桿菌

CCL 選択培地にて CCL 耐性菌の検索を行ったところ CCL 耐性菌は 50 名全員より, また, CCL 耐性嫌気性グラム陰性桿菌は 50 名中 46 名 (92%) から検出された。CCL 耐性嫌気性グラム陰性桿菌は 91 株分離され, 同定の結果, *P. melaninogenica*, *P. intermedia* などの BPGNR が多かった (Table 1)。

β -Lactamase 産生株は 88 株 (96.7%) 認められ, 菌種間による差異はみられなかった (Table 1)。

CCL 耐性嫌気性グラム陰性桿菌に対する供試 β -lac-

Table 1. Distribution of cefaclor-resistant anaerobic gram-negative bacteria in saliva

Species	Number of isolates	Ratio of β -lactamase producers (%)
<i>Prevotella melaninogenica</i> ¹⁾	58	100
<i>Prevotella intermedia</i> ¹⁾	15	100
<i>Prevotella loescheii</i> ¹⁾	4	100
<i>Prevotella denticola</i> ¹⁾	3	100
<i>Prevotella corporis</i> ¹⁾	1	100
<i>Prevotella buccae</i>	1	100
<i>Prevotella oris</i>	1	100
Unidentified	8	63
Total	91	97

¹⁾ Black-pigmented gram-negative rods

Table 2. MIC and MIC₉₀ of β -lactam antibiotics against cefaclor-resistant bacteria (91 strains) isolated from saliva

Antibiotics	MIC (μ g/ml)											MIC ₉₀ (μ g/ml)	
	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		>256
ABPC	1	2			1		1	6	24	34	21	1	256
CEZ		1	1	4	5	18	11	25	20	5	1		64
CCL								2		18	35	41	>256
CMZ	8	19	31	24	5	1	3						2
LMOX	1		1	9	31	35	11		3				16
CZX	1	3	3	3	4	5	16	19	23	11	3		128
CFTM	1			2	1	9	10	23	28	13	3	1	128
IPM	90	1											≤ 0.25

ABPC: ampicillin, CEZ: cefazolin, CCL: cefaclor, CMZ: cefmetazole, LMOX: latamoxef, CZX: ceftizoxime, CFTM: ceftoram, IPM: imipenem

Table 3. MIC of β -lactam antibiotics against *Prevotella melaninogenica* (58 strains) and *Prevotella intermedia* (15 strains) isolated from saliva

Antibiotics	Strains	MIC (μ g/ml)											
		≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
ABPC	<i>P. melaninogenica</i>						1		1	4	15	22	15
	<i>P. intermedia</i>									1	7	6	1
CEZ	<i>P. melaninogenica</i>		1	1	1	4	11	7	16	13	4		
	<i>P. intermedia</i>				1		4	4	2	3		1	
CCL	<i>P. melaninogenica</i>								1		9	26	28
	<i>P. intermedia</i>								1			7	8
CMZ	<i>P. melaninogenica</i>	5	6	24	19	3		1					
	<i>P. intermedia</i>	2	11	1				1					
LMOX	<i>P. melaninogenica</i>			1	4	18	25	8		2			
	<i>P. intermedia</i>				2	11	2						
CZX	<i>P. melaninogenica</i>	1	1	1	1	4	3	11	11	17	7	1	
	<i>P. intermedia</i>						2	4	6	2		1	
CFTM	<i>P. melaninogenica</i>				2	1	2	8	13	19	11	2	
	<i>P. intermedia</i>						3	2	7	3			
IPM	<i>P. melaninogenica</i>	57	1										
	<i>P. intermedia</i>	15											

ABPC: ampicillin, CEZ: cefazolin, CCL: cefaclor, CMZ: cefmetazole, LMOX: latamoxef, CZX: ceftizoxime, CFTM: ceftoram, IPM: imipenem

tam 薬の MIC₉₀ は CCL で >256 μ g/ml, ABPC で 256 μ g/ml, CZX および CFTM が 128 μ g/ml, ついで, CEZ, LMOX, CMZ, IPM の順で大きかった (Table 2)。 *P. melaninogenica* と *P. intermedia* の β -lactam 薬に対する感受性を比較した結果, 供試 β -lactam 薬間ではほとんど差異はみられなかった (Table 3)。

Plasmid band は *P. melaninogenica* 15 株, *P. intermedia* 2 株および unidentified 1 株の合計 18 株 (19.8%) で観察された。 Plasmid の大きさは 2.0~15.0 kb の間で, 菌株あたり 1~数個認められた (Fig. 1)。

2. CCL 耐性因子の伝達

1) 伝達率

Filter mating 法により耐性因子を伝達し, CCL 選択培地にて耐性 transconjugants を選択したところ, 7.9×10^{-5} の頻度で耐性化が生じた。

2) Transconjugants の性状

得られた transconjugants のなかから任意に 5 株を分離し, 性状を調べた結果を Tables 4, 5 に示した。

Table 4. β -Lactamase productivity and activity of donor, recipient and transconjugants

Strains	β -Lactamase productivity	β -Lactamase activity (mU/mg)	
		ABPC ^{a)}	CCL ^{b)}
Donor			
<i>P. intermedia</i> T 5001	positive	15.5	160.7
Recipient			
<i>B. capillosus</i> K 8085	negative	—	—
Transconjugants ^{a)}	positive	23.7~70.6	456.8~550.2

ABPC: ampicillin, CCL: cefaclor,

^{a)} substrate

^{b)} 5 strains

Transconjugants の β -lactamase 産生性はすべて陽性であり, その酵素活性は基質 ABPC, CCL ともに donor より増加し, 前者では 1.5~4.6 倍, 後者では 2.8~3.4 倍となった (Table 4)。

Transconjugants に対する供試薬剤の MIC は, recipient に対するそれよりもいずれの薬剤とも大きかった (Table 5)。 Plasmid は donor, recipient および

Table 5. MIC of β -lactam antibiotics against donor, recipient and transconjugants

Strains	MIC (μ g/ml)							
	ABPC	CEZ	CCL	CMZ	LMOX	CZX	CFTM	IPM
Donor								
<i>P. intermedia</i> T 5001	128	16	128	≤ 0.25	2	16	32	≤ 0.25
Recipient								
<i>B. capillosus</i> K 8085	≤ 0.25	≤ 0.25	32	1	0.5	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
Transconjugants ¹⁾	>256	64	>256	2~4	16	2~4	128	≤ 0.25

ABPC: ampicillin, CEZ: cefazolin, CCL: cefaclor, CMZ: cefmetazole, LMOX: latamoxef, CZX: ceftizoxime, CFTM: cefteteram, IPM: imipenem

¹⁾ 5 strains

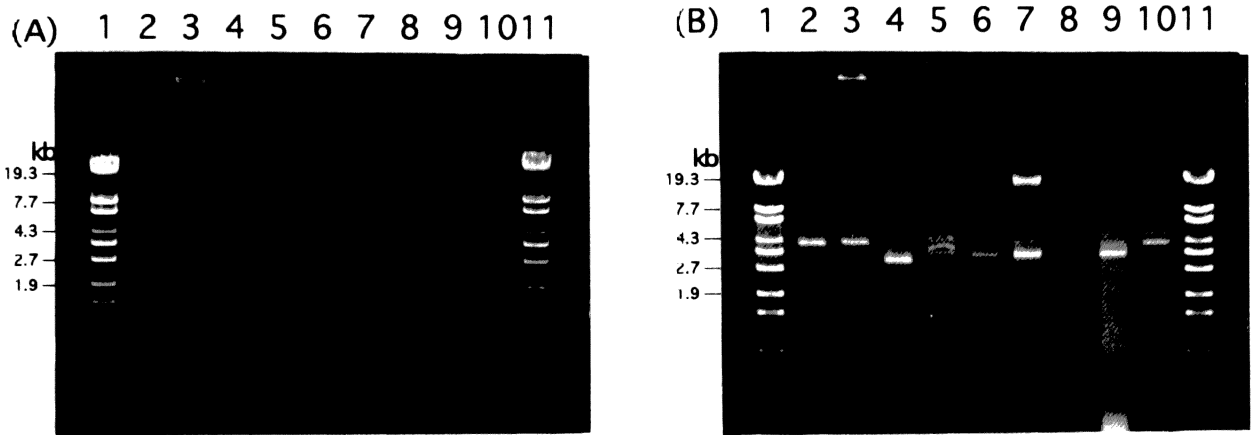


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the plasmid DNA of cefaclor-resistant anaerobic gram-negative rods isolated from saliva.

(A) Lanes 1 and 11, sizemarker λ -Eco T14 I digest.

Lane 2, *Prevotella intermedia* R 32001. Lane 3, *Prevotella melaninogenica* R 32003.

Lane 4, *P. melaninogenica* R 32023. Lane 5, *P. melaninogenica* R 32030.

Lane 6, *P. melaninogenica* R 32032. Lane 7, *P. intermedia* R 32037.

Lane 8, *P. melaninogenica* R 32053. Lane 9, *P. melaninogenica* R 32058.

Lane 10, *P. melaninogenica* R 32067.

(B) Lanes 1 and 11, sizemarker λ -Eco T14 I digest.

Lane 2, *P. melaninogenica* R 32073. Lane 3, *P. melaninogenica* R 32081.

Lane 4, *P. melaninogenica* R 32084. Lane 5, *P. melaninogenica* R 32091.

Lane 6, *P. melaninogenica* R 32094. Lane 7, *P. melaninogenica* R 32096.

Lane 8, *P. melaninogenica* R 32106. Lane 9, *P. melaninogenica* R 32119.

Lane 10, unidentified R 32123.

transconjugants ともに検出されなかった。

III. 考 察

菌性感染症における β -lactam 薬耐性菌出現機構を解明するため、口腔常在菌叢の 1 つである唾液中の嫌気性菌を CCL 選択培地で選択した。その結果、被検者全員より β -lactam 薬耐性菌が検出され、菌性感染症で重要視されている嫌気性グラム陰性桿菌の耐性株は、50 名中 46 名 (92%) から分離された。 β -lactam 薬耐性菌が常在菌叢から分離された理由として、現代の医療では感染症治療や感染予防などの目的で種々の抗菌薬が頻繁に使用され、常在菌は常にこれら抗菌薬にさらされることとなり、環境に適応するために耐性を

獲得している^{17,22)}と考えられる。

分離した嫌気性グラム陰性桿菌は、*P. melaninogenica* や *P. intermedia* など BPGNR が多かった。大宮¹⁷⁾は小児の唾液中の PCG 耐性菌で *P. melaninogenica* がもっとも優位に分離されたことを報告し、*P. melaninogenica* を含む *Prevotella* が β -lactam 薬に耐性化しやすいことを示唆している。しかし、松本⁶⁾、多々見⁶⁾ および木下ら¹¹⁾は菌性感染症では *P. melaninogenica* よりも *P. intermedia* が優位に分離されると述べている。この原因は、口腔常在菌叢では *P. melaninogenica* と *P. intermedia* に対する β -lactam 薬の MIC や両菌株の β -lactamase 産生性に差はない

が、治療目的で投与された薬剤に対する適応力が *P. intermedia* で高く、また、種々の病原酵素を多く持っていることが菌性感染症で優位に分離される結果に至ったと推定される。しかし、この点については今後さらに検討したい。

嫌気性グラム陰性桿菌に対する供試 β -lactam 薬の MIC₉₀ は ABPC および CCL でそれぞれ 256, >256 μ g/ml と大きく、CMZ や IPM ではそれぞれ 2, \leq 0.25 μ g/ml と小さかった。この結果は、木下ら¹⁾の ABPC 耐性菌の分離頻度が高い菌性感染症 2 症例における MIC₉₀ 値 (ABPC 100 μ g/ml, CCL 200~>200 μ g/ml, CMZ 1.56 μ g/ml, IPM \leq 0.39 μ g/ml) に類似していた。また、 β -lactamase 産生株がほとんどであったことも考えあわせると、内因感染症である菌性感染症の発症時にはこれらの菌株が菌交代症の中心となって本症の薬剤耐性化に関与すると考えられる。

感受性菌の耐性化の一因として、耐性因子の伝達を検討したところ、 7.9×10^{-5} の頻度で β -lactam 薬耐性 transconjugants が分離された。このことは病巣内でも感受性菌が耐性化しうることを示唆している。田中ら³³⁾は菌性感染症由来 β -lactamase 陽性 *P. intermedia* を ABPC を用いて、*in vitro* 耐性菌を選択したとき、 β -lactamase 活性値と β -lactam 薬の MIC が上昇することを報告している。この研究は薬剤投与により耐性菌がさらに高度耐性化する可能性を示唆している。

Cuchural ら³⁴⁾は *Bacteroides fragilis* において plasmid によらない β -lactam 薬耐性因子の伝達を、また、Guiney ら³⁵⁾は tetracycline と penicillin 耐性の *P. denticola* および *P. intermedia* で非 plasmid 性の伝達を報告している。本研究でも唾液中 β -lactam 薬耐性嫌気性グラム陰性桿菌において、plasmid は 18 株から検出されたが、その大きさ、個数は一定でないことや、残りの菌株からは検出されなかったこと、また、耐性因子伝達時の donor, recipient および transconjugants から plasmid は検出されなかったことなどから、本研究で明らかになった耐性因子の伝達は非 plasmid 性と考えられる。

以上の事実から、菌性感染症における嫌気性グラム陰性桿菌の β -lactam 薬耐性化には、(1) 常在菌叢中に β -lactamase 産生・ β -lactam 薬耐性株が存在すること、(2) 染色体性の β -lactam 薬耐性因子が細菌間で伝達される可能性があること、(3) 薬剤によって耐性菌が選択され、その構成比率が増加するとともに β -lactamase 高度産生・ β -lactam 薬高度耐性株になることなどが複合して関与するものと推定される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲をいただきました大阪歯科大学口腔外科学第 1 講座白数力也教授、ならびに同細菌学講座佐川寛典教授に深甚

の謝意を表します。直接のご指導とご助言をいただきました同細菌学講座尾上孝利講師、同口腔外科学第 1 講座村田雄一助手および松本和浩助手、耐性因子の伝達に関してご援助いただきました大阪大学微生物病研究所感染症研究部門細菌毒素学分野松田守弘教授、堀口安彦助手および片平じゅん助手に深謝いたします。本研究にご協力下さいました大阪歯科大学口腔外科学第 1 講座、同細菌学講座、大阪大学微生物病研究所感染症研究部門細菌毒素学分野各位に謝意を表します。

抗菌薬の原末を提供していただきました各製薬会社にお礼申し上げます。

本研究の一部は平成 6 年度大阪歯科大学学術研究奨励助成金 (A 94-05) によるものである。

本論文の要旨は、第 43 回日本化学療法学会西日本支部総会 (平成 7 年 12 月 8 日、宜野湾市) にて発表した。

文 献

- 1) 木下 智, 他: 菌性感染症から分離した細菌の β -lactam 薬感受性. 日本化学療法学会雑誌 43: 1025~1030, 1995
- 2) 口腔細菌学談話会: 口腔微生物叢. 菌学微生物学 (口腔細菌学談話会編) p. 230~242, 医歯薬出版, 東京, 1986
- 3) 大野康亮, 他: 口腔外科領域感染症の検出菌の検討. 歯薬療法 3: 78~91, 1984
- 4) 植松政孝, 坂本春生, 金子明寛, 森島 丘, 森鼻健史, 佐々木次郎, 池田政勝: 口腔領域化膿性炎よりの検出菌と薬剤感受性 東海大学病院口腔外科最近 6 年 (1977~1982) の統計. 歯薬療法 3: 117~121, 1984
- 5) 松本和浩: 閉鎖性の歯槽膿瘍の細菌学的研究. 日口外誌 36: 2016~2034, 1990
- 6) 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
- 7) 小俣裕昭, 小宮正道, 秋元芳明, 金子賢司, 藤井 彰: Lenampicillin 経口投与後のヒト血液および口腔組織への ampicillin の移行について. Chemotherapy 42: 172~176, 1994
- 8) 内藤博之: 新規口セフェム剤の薬動学的検討—同一被検者による比較—. 歯薬療法 12: 8~16, 1993
- 9) 影向範昭, 他: 歯科における抗菌剤の使用傾向—全国歯科大学附属 29 病院における使用実態調査—. 歯薬療法 13: 39~47, 1994
- 10) Nord C E, Hedberg M: Resistance to β -lactam antibiotics in anaerobic bacteria. Rev Infect Dis 12 Supplement 2: s231~s234, 1990
- 11) Piddock L J V, Griggs D J: Selection and characterization of cefepime-resistant Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 28: 669~676, 1991
- 12) 澤井哲夫, 平松啓一, 小此木研二, 中江太治: β -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
- 13) Gotoh N, Itoh N, Tsujimoto H, Yamagishi J, Oyamada Y, Nishino T: Isolation of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by transposon

- insertion mutagenesis: evidence of involvement in multiple antibiotic resistance. FEMS Microbiol Lett 122: 267~274, 1994
- 14) 江龍多美子, 尾上孝利: ヒト口腔由来 *Prevotella intermedia* の β -Lactamase 活性. 歯科医学 56: 309~320, 1993
 - 15) 田中裕之, 尾上孝利, 大宮真紀, 杉原圭子, 北条博一, 佐川寛典, 黒田洋生: β -Lactamase 阻害剤による *Prevotella intermedia* β -lactamase 活性の阻害. 歯基礎誌 37 抄録集: 122, 1995
 - 16) 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. 歯科医学 57: 153~166, 1994
 - 17) 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
 - 18) Syed S A, Loesche W J: Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl Microbiol 24: 638~644, 1972
 - 19) Koneman E W, Allen S D, Dowell V R Jr., Janda W M, Sommers H M, Winn W C Jr. : The anaerobic bacteria. In Color atlas and textbook of diagnostic microbiology p. 406~408, J. B. Lippincott, Philadelphia, 1988
 - 20) 佐野寿哉, 他: ヒト口腔より分離した偏性嫌気性グラム陰性桿菌の薬剤感受性. 第 44 回日本感染症学会東日本地方会総会・第 42 回日本化学療法学会東日本支部総会/合同学会プログラム・講演抄録集: 56, 1995
 - 21) Ezaki T, Hashimoto Y, Yamamoto H, Lucida M L, Liu 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
 - 22) 江崎孝行, Adnan S, 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
 - 23) 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
 - 24) Holdeman L V, Kelley R W, Moore W E C : Anaerobic Gram-negative straight, curved and helical rods. In Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1 (Krieg N R, Holt J G eds.) p. 602~631, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984
 - 25) Shah H N, Collins M D: Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. Int J Syst Bacteriol 38: 128~131, 1988
 - 26) Shah H N, Collins M D: *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. Int J Syst Bacteriol 40: 205~208, 1990
 - 27) Sato K, Matsuura Y, Inoue M, Mitsuhashi S: Properties of a new penicillinase type produced by *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 22: 579~584, 1982
 - 28) Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. Biochem J 139: 789~790, 1974
 - 29) 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—. Chemotherapy 38: 102~105, 1990
 - 30) Birnboim H C, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7: 1513~1523, 1979
 - 31) 大内 清, 島田和典: プラスミドの取り扱い方. 遺伝子工学ハンドブック (村松正実, 岡山博人編) p. 19~25, 羊土社, 東京, 1991
 - 32) 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 β -lactamase 活性. 歯科医学 57: 217~232, 1994
 - 33) 田中裕之, 尾上孝利, 北条博一, 岡 健司, 姜 奎錫, 佐川寛典, 黒田洋生: 口腔感染症由来 *Prevotella intermedia* における β -lactam 剤高度耐性株の選別と β -lactamase 活性の誘導. 日口診誌 8: 291~297, 1995
 - 34) Cuchural G J Jr., Tally F P, Storey J R, Malamy M H: Transfer of β -lactamase-associated cefoxitin resistance in *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 29: 918~920, 1986
 - 35) Guiney D G, Hasegawa P: Transfer of conjugal elements in oral black-pigmented *Bacteroides* (*Prevotella*) spp. involves DNA rearrangements. J Bacteriol 174: 4853~4855, 1992

Study on the mechanism of occurrence of β -lactam antibiotic-resistant bacteria in odontogenic infection

Satoshi Kinoshita

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka Dental University,
1-5-31 Otemae, Chuo-ku, Osaka 540, Japan

The distribution of β -lactam-antibiotic-resistant bacteria among normal oral microbial flora and the transfer of β -lactam-resistance factor were examined to assess the mechanism of occurrence of β -lactam-resistant bacteria in odontogenic infection. When an attempt to detect β -lactam-resistant bacteria among the normal flora was made in saliva by culturing on selective medium containing 32 $\mu\text{g/ml}$ cefaclor (CCL), they were found in all subjects tested. Ninety-one isolates of gram-negative rods isolated from the saliva were almost all black-pigmented gram-negative rods and included *Prevotella melaninogenica* and *Prevotella intermedia*, and 88 strains (96.7%) of β -lactamase producers were detected. The MIC_{90s} of CCL and ampicillin against anaerobic gram-negative rods were the highest among the β -lactams used, $\geq 256 \mu\text{g/ml}$. The MIC_{90s} of ceftizoxime, cefteteram, cefazolin and latamoxef were moderate, 16~128 $\mu\text{g/ml}$, and those of cefmetazole and imipenem were 2 and $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$, respectively. β -Lactam-resistance factor was transferred from β -lactamase producer/ β -lactam-resistant *P. intermedia* T5001 isolated from odontogenic infection to β -lactamase non-producer/ β -lactam-sensitive *Bacteroides capillosus* K8085 by the filter-mating procedure. The frequency of transfer was 7.9×10^{-8} . Five transconjugants isolated were β -lactamase producers and exhibited β -lactam-resistance. However, it was impossible to detect the donor, recipient and transconjugants with plasmids. These findings suggest that the presence of β -lactam-resistant bacteria among normal oral microbial flora, and the transfer of β -lactam-resistance factor from β -lactam-resistant strains to sensitive strains are involved in the occurrence of β -lactam-resistant bacteria in odontogenic infection. It also appears that β -lactam-resistance factor is present in the chromosomal DNA.