

【原著・基礎】

健康成人唾液から分離された ampicillin 耐性 streptococci の β -lactam 薬感受性と penicillin binding proteins に関する研究

佐々木文彦

鶴見大学歯学部第2口腔外科学教室（主任: 石橋克禮教授）

（平成10年7月9日受付・平成10年8月28日受理）

健康成人唾液中より ampicillin (ABPC) 1 μ g/ml 含有 Mitis-Salivarius 寒天平板を用い ABPC 耐性 streptococci を検索したところ、被検者 74 名中 56 名 (75.7%) より耐性株が検出された。分離された 154 株の ABPC 耐性 streptococci を生化学的性状により同定した結果、*Streptococcus parasanguis* が 80 株 (51.9%) を占め、*Streptococcus oralis* 33 株 (21.4%)、*Streptococcus mitis* 7 株 (4.5%) であった。MIC 値の範囲は、ABPC 1~16 μ g/ml, cefaclor (CCL) 2~>128 μ g/ml, imipenem (IPM) \leq 0.06~2 μ g/ml であり、各株における 3 薬剤の MIC 値は必ずしも平行していなかった。*S. parasanguis*, *S. mitis* の分離株の penicillin binding proteins (PBPs) の fluorogram におけるバンドパターンには菌株ごとにバリエーションがあり、polymerase chain reaction (PCR) 法で検討した 16S-rRNA 領域の遺伝子的背景が一致した株同士でも異なっていた。これらの株の個々の PBP と ABPC, CCL, IPM の親和性には薬剤間で差異がみられたが、薬剤の MIC 値と総 PBPs バンド濃度を 50% 減弱させる薬剤濃度 (IC₅₀ 値) には 3 薬剤とも関連性が認められた。*S. mitis* の耐性分離株で PBP2b, 2x 遺伝子保存領域を PCR 法により検索した結果では少なくとも PBP2b に変異があることが示唆された。口腔常在菌叢中の β -lactam 薬耐性 streptococci は健康人において普遍的に存在する可能性があり、潜在的病原性と *Streptococcus pneumoniae* への耐性遺伝子の供給の両面で重要であると考えられる。

Key words: oral streptococci, penicillin binding proteins, β -lactam 薬耐性

Oral streptococci は口腔のすべての部位から分離されるもっとも優勢な細菌群であるが¹⁾、その一方で、口腔閉塞膿瘍、感染性心内膜炎などの疾患の発症にも関与している²⁻⁴⁾。近年、本菌属の一部の菌種において、本来感受性が良好であった β -lactam 薬に対し、薬剤作用点である penicillin binding proteins (PBPs) の変異による耐性化が報告されている⁵⁻⁷⁾。また、penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) の出現は遺伝子的に近縁な oral streptococci との間で PBP 遺伝子の組換えがおこった結果であるとの推測があり⁸⁾、PRSP への耐性遺伝子の供給源としても注目されている^{9,10)}。

一方、歯科領域においては β -lactam 薬は経口ペニシリン、経口セフェム薬を中心に多用されている¹⁾。特に ampicillin (ABPC) は主としてレナンプシリン、バカンピシリンなどの経口投与用プロドラッグの形で臨床で広く用いられるとともに、感染性心内膜炎の予防および治療にも高頻度で使用されている^{3,11)}。

これらの背景をふまえて、本研究では、潜在的病原性を持ち、その感染症治療を想定した場合に問題となりうる ABPC 耐性 oral streptococci について唾液を用いて検索し、

健康成人における保菌率および耐性株の総 streptococci に占める割合を検討した。また、分離株について、 β -lactam 薬に対する耐性パターンと耐性機序を知る目的で、ABPC, cefaclor (CCL), imipenem (IPM) に対する薬剤感受性を測定し、一部の株の PBPs のこれら 3 薬剤に対する親和性を感受性株と比較した。さらに、polymerase chain reaction (PCR) 法により分離株の 16S-ribosomal RNA の遺伝子背景、および β -lactam 薬耐性との関連が指摘されている *Streptococcus mitis* の PBP2b, 2x 遺伝子の変異に関して検索を行った。

I. 材料と方法

1. 基準菌株

基準菌株として、*S. mitis* ATCC 49456, *Streptococcus oralis* NCTC 11427, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus parasanguis* ATCC 15912, *Streptococcus gordonii* ATCC 10558 を使用した。

2. 使用薬剤

β -lactam 薬として ABPC (明治製薬)、CCL (塩野義製薬)、IPM (萬有製薬) の力価が明らかな原末を使用した。

3. 検討方法

1) 健康成人唾液中の ABPC 耐性 oral streptococci の検索

試料採取前 6 か月間に抗菌薬を服用していない健康成人 74 名 (年齢 21~25 歳) を対象とした。無刺激唾液を採取直後に GAM broth (日本製薬) にて 10 倍階段希釈し、希釈液各 50 μ l を Mitis-Salivarius agar (MSA; Difco, MI, USA) 平板および ABPC 1 μ g/ml 含有 MSA 平板に塗抹した。嫌気チャンパー (MIP-1025; Forma Scientific, Ohio, USA) 内で H₂ 8%, CO₂ 12%, N₂ 80% 条件下, 37°C, 48 時間培養し、生育したコロニー数より総 streptococci 数および ABPC に対する耐性 streptococci 数を算出した。ABPC 1 μ g/ml 含有 MSA 平板上に生育したコロニーから釣菌し、再度同平板上での生育が確認された菌株を耐性とし、グラム染色、カタラーゼテストを行った。また、 β -lactamase の産生能をニトロセフィンディスク (Cefinase, Becton Dickinson, MD, USA) にて調べた。

2) 分離株の生化学的性状による菌種同定

分離されたカタラーゼ陰性グラム陽性球菌について、Beighton らの方法¹²⁾ により、糖分解性および蛍光基質 (4-methylumbelliferyl 誘導体, Sigma, Mo, USA) を用いた glycosidase 活性から streptococci の菌種を同定した。酵素活性による蛍光発色は 96 穴 ELISA 用マルチプレート (スミロン) 上で、マルチプレートリーダー (CYTO FLUOR II; Perseptive Biosystems, MA, USA) により判定した。

3) 分離菌株の β -lactam 薬感受性

Streptococci と同定された株を対象に、微量液体希釈法による MIC 測定を日本化学療法学会標準法¹³⁾ に準じて行った。

4) Penicillin binding proteins (PBPs) の検討

(1) Fluorography による PBPs の検出

Usui¹⁴⁾ の記述に従い、被験菌の膜画分と phenyl-4 (n)-³H-benzyl-penicillin (³H-PCG; 777GBq/mM, 37 MBq/ml, Amersham Life Science, Bucks, UK) を用いて fluorography を行い、PBPs を X 線フィルム上の黒化バンドとして検出した。

(2) β -lactam 薬と PBPs との親和性の検討

被験菌の膜画分に ABPC, CCL, IPM のいずれかの薬剤の MIC 値付近を中心とした 4 倍希釈系列を加えて 32°C, 30 分間反応後, ³H-PCG を加えた。以降の手順は通常の fluorography と同様に行った。PBPs のバンド濃度をデンスitomーター (Microdensitometer 3CS; Joyce Loebel, UK) で測定し, ³H-PCG のみを反応させたレーンの黒化バンド濃度を 100% としてバンド濃度が 50% に減弱する各薬剤の添加濃度 (IC₅₀) を算出した。

5) PCR 法による遺伝子検索

(1) 被験菌からの DNA 抽出

被験菌の DNA はグラム陽性菌用 DNA 分離キット (Puregene; GENTRA SYSTEMS, MN, USA) により抽出し、分光光度計 (UV-1200; 島津製作所) にて、260 nm の吸光度から濃度を算出した。

(2) PCR 用プライマー

PCR 用プライマーは Table 1 に示した。さらに *S. mitis* については、Garnier らにより報告された D-Ala-D-Ala ligase 遺伝子の *S. mitis* 同定用のプライマー¹⁵⁾ も使用した。

(3) PCR による遺伝子検索

緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, pH 8.8; サワディーテクノロジー, 東京) 中に、0.625mM dNTP (サワディーテクノロジー, 東京), 0.25 μ M 各プライマーセット, 0.025U/ μ l Taq DNA polymerase (Super Taq DNA Polymerase; サワディーテクノロジー, 東京), 各菌株 DNA 10 ng/ μ l となるよう反応液を調製した。試料をサーマルサイクラー

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers

Target gene	Referenced sequences	Primer name	Oligodeoxynucleotide sequence	PCR product (size, bp)	
16 S-rRNA	<i>S. parasanguis</i>	upstream primer	1	5'-AGCTTGCTGCTGACCCGAGC	Spa-16 S (352)
			2	5'-GAGTAGATGTTGCATGACATTTAC	So-16 S (244)
			3	5'-AAGGAGGAGCTTGCTTCTCC	Sm-16 S (352)
			4	5'-GAGAGGAGCTTGCTTCTCTT	Ss-16 S (351)
		downstream primer	16 S-D1	5'-AACCTTCTTCACTCACCGGC	
pbp 2 b	<i>S. mitis</i>	upstream primer	Sm 2 B-1	5'-ATTAATTCCTGGTACACTCAGG	Sm 2 B-1 (240)
			Sm 2 B-2	5'-TTGGCCTTCCAAGATAGCG	Sm 2 B-2 (561)
			Sm 2 B-3	5'-AGACCTTGACAGACCAACCG	Sm 2 B-3 (284)
			Sm 2 B-4	5'-TCAGGCTTACGGTTCATTCC	Sm 2 B-4 (223)
		downstream primer	2 B-D	5'-AGTTGACTCATCTGGAAGGTC	
pbp 2 x	<i>S. mitis</i>	upstream primer	Sm 2 X-U	5'-CAACCATGAAGGTCATGACG	Sm 2 X (919)
		downstream primer	2 X-D	5'-TCCTTGATGCTAGGCATTGC	

(Quick Thermo Personal QTP-I; 日本ジェネティクス, 東京) にセットし, first denature 94°C, 5 分間の後, 94°C 1 分間, 55 または 56°C 1 分間, 72°C 1 分間で 20 サイクルの反応を行い, さらに 72°C, 10 分間の伸長反応を行った。各試料は 1 μg/ml エチジウムブロマイド含有 1% アガロースゲルを用い, 緩衝液 (pH 8.0, 0.02 M Tris, 7.5 mM acetic acid, 1.0 mM EDTA-2Na) 中で電気泳動し, トランスイルミネーター (UVP, CA, USA) により PCR 産物の有無を確認した。

II. 結 果

前項に述べた材料および検討方法を用い, 以下の結果を得た。

1. 健康成人唾液中の ABPC 耐性 oral streptococci の検索

74 名の被験者より ABPC 1 μg/ml 含有 MSA 平板に生育可能な ABPC 耐性 streptococci を検索したところ, 56 名 (75.7%) で耐性株が検出された。検出菌数は $2.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^8$ cfu/ml の範囲で, 相乗平均は 1.0×10^6 cfu/ml, 耐性株の総 streptococci 中に占める割合は平均 0.027% であった。

2. 分離菌株の生化学的性状による菌種同定

ABPC 1 μg/ml 含有 MSA 平板から分離可能であったカタラーゼ陰性, グラム陽性球菌を Beighton らの方法¹² で生化学的性状により菌種を同定したところ, 170 株中 154 株が oral streptococci であり, *S. parasanguis* が 80 株 (51.9%), *S. oralis* 33 株 (21.4%), *S. mitis* 7 株 (4.5%), 同定不能 34 株 (22.1%) であった。

3. ABPC 耐性 streptococci の β-lactam 薬に対する感受性

分離株のうち, streptococci と同定された株の MIC 値を測定した。ABPC の MIC 値は 1~16 μg/ml の範囲であり, CCL 2~>128 μg/ml, IPM ≤0.06~2 μg/ml であった。ABPC の MIC 値ごとに菌株を識別し, グラフにより CCL, IPM の MIC 値分布と比較したところ, 各菌株の 3 薬剤に対する感受性は必ずしも平行していなかった (Fig. 1)。また, β-lactamase 活性は全株陰性であった。

4. PBP_s バンドパターンと薬剤親和性

S. parasanguis の基準菌株, 唾液由来感受性株 1 株 (S 7-4 株), 耐性株 6 株 (A 16-8 株, A 21-7 株, A 16-14 株, B 12-2 株, 5-1 株), および *S. mitis* の基準菌株, 感受性株 1 株 (S-5 株), 耐性株 1 株 (B 3-6 株) について PBP_s バンドパターンを比較したところ, 両菌種とも被験菌株ごとにバリエーションがみられ, 基準菌株とは一致しなかった (Fig. 2)。これらの株の PBP_s と ABPC, CCL, IPM との親和性を competitive assay により検討した。Fig. 3 には *S. parasanguis* 分離株のうち PBP_s バンドパターンが類似していた ABPC 感受性株 S 7-4 株および耐性株 5-1 株の fluorogram, Fig. 4 にその PBP_s バンド濃度の減衰グラフを示した。PBP_s は分子量の大きい順にナンバーリングした。S 7-4 株 (ABPC MIC=0.25 μg/ml) の総 PBP_s バンド濃度は ABPC 添加により急速に減弱し, 0.5 μg/ml 添加時には無添加時の 20% 以下となったが, 5-1 株 (ABPC MIC = 16 μg/ml) では同量添加時にも約 60% が残存した。CCL 添加時, S 7-4 株 (CCL MIC = 8 μg/ml) の総 PBP バンド濃度は 8 μg/ml 添加時に無添加時の 25% 以下まで減弱したのに対し, 5-1 株 (CCL MIC=512 μg/ml) では 128 μg/ml 添加時においても 4 本の PBP バンドが残存した。5-1 株の高分子量

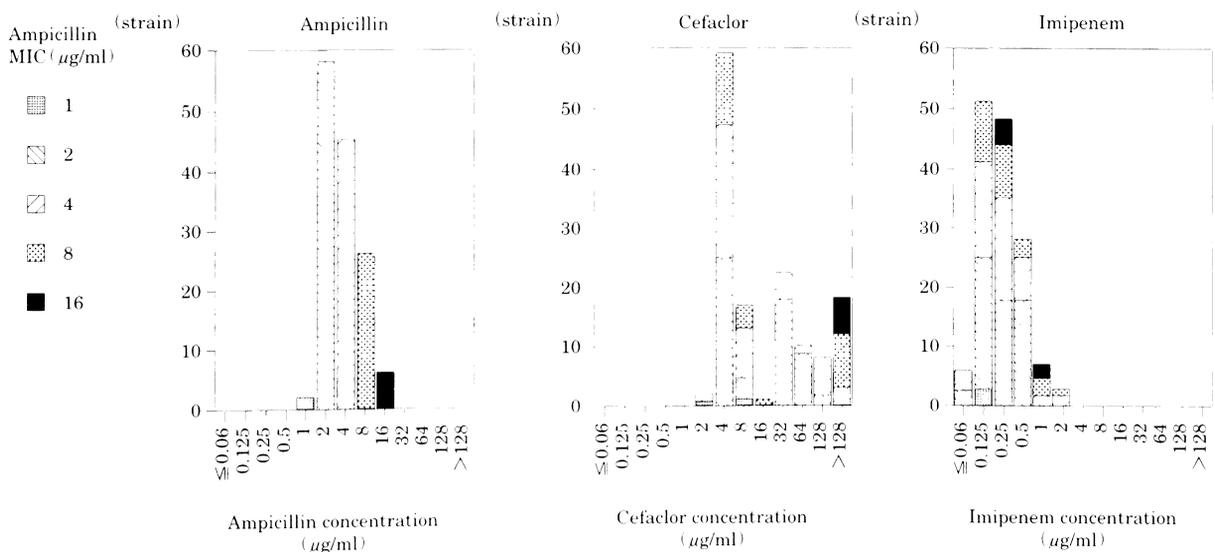


Fig. 1. Susceptibility distribution of ampicillin (ABPC) resistant strain of streptococci isolated from healthy adults' saliva against β-lactam antibiotics. Each isolate was distinguished by the MIC value for ABPC.

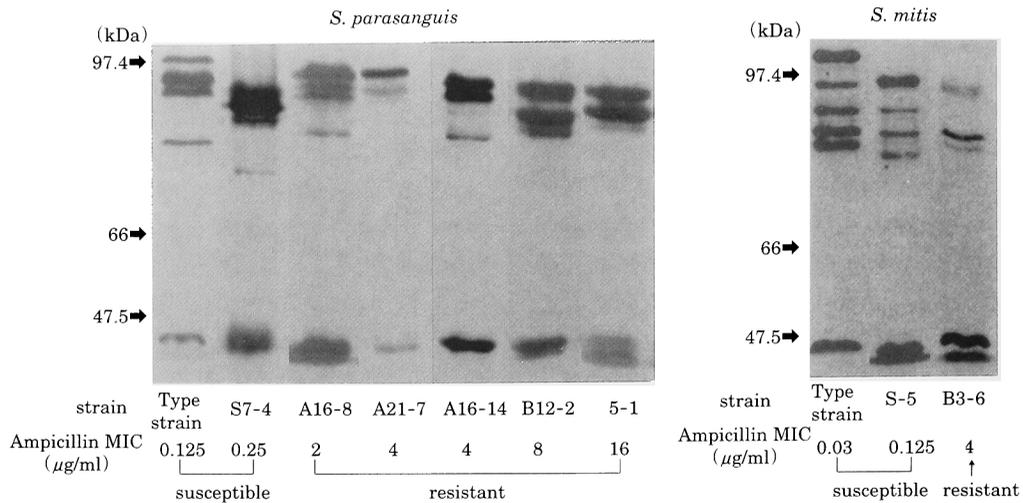


Fig. 2. Fluorographic patterns of penicillin-binding proteins (PBPs) in *Streptococcus parasanguis* and *Streptococcus mitis*.

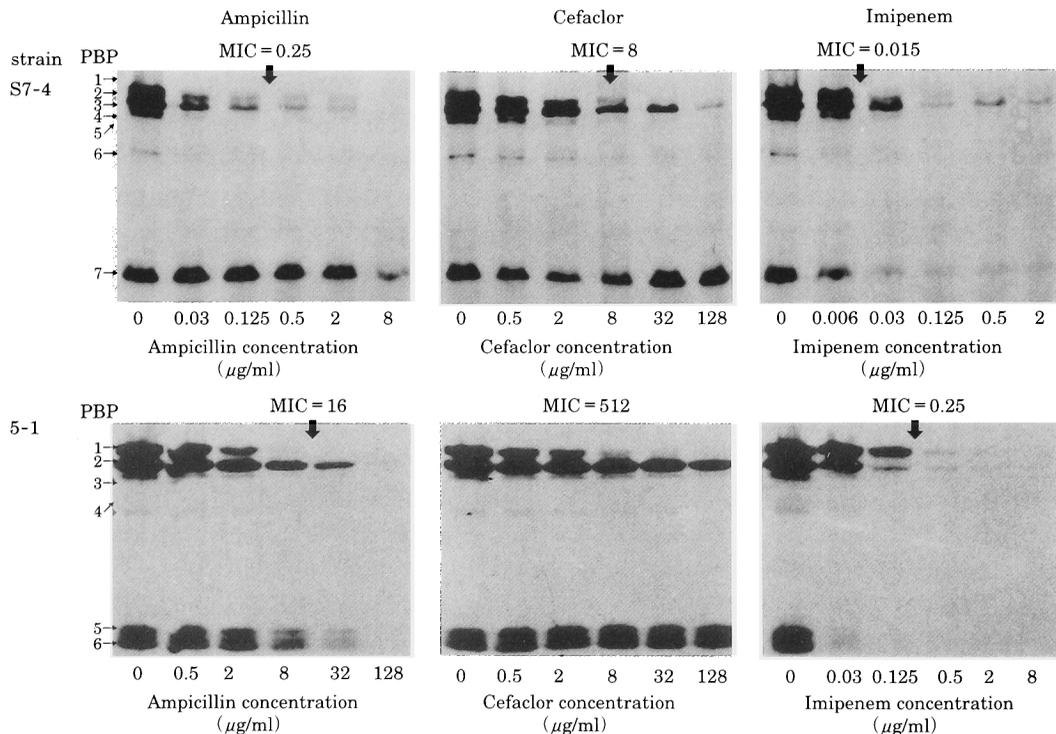


Fig. 3. Fluorographic patterns of PBPs in ampicillin (ABPC) susceptible strain S 7-4 and ABPC resistant strain 5-1 of the *Streptococcus parasanguis* showing competitive binding between ^3H -PCG and ABPC, or cefaclor or imipenem.

PBPs の中では PBP2 (分子量 86.9kDa) が両薬剤に対する親和性がもっとも低かった。IPM 添加の場合、S 7-4 株 (IPM MIC = 0.015 $\mu\text{g/ml}$) の全 PBPs バンドはほぼ均等に減弱したが、5-1 株 (IPM MIC = 0.25 $\mu\text{g/ml}$) では PBP 1, 2 の高分子バンドが低分子バンドよりも緩徐に減弱する傾向がみられた。

全被験菌株の総 PBPs バンドおよび各 PBP バンドの IC_{50} を Tables 2, 3 に示した。S. parasanguis では 40 kDa 前後の低分子量バンドは ABPC, CCL との親和性が低く、MIC で IC_{50} に達しない菌株が多かったが、

IPM とは比較的親和性が高かった。各菌株のもっとも薬剤低親和性のバンドは薬剤ごとに異なる傾向を示す一方、総 PBPs バンドの減衰は、MIC 値が高い株ほど緩徐であった (Fig. 5)。全被験菌株について総 PBPs の IC_{50} と MIC との関係を検討したところ、相関係数は ABPC 0.865, CCL 0.792, IPM 0.862 であり、いずれも有意な相関 ($P < 0.05$) が認められた。S. mitis では S. parasanguis に比較して PBPs バンドの消失が早く、特に低分子量の PBP バンドが ABPC, CCL, IPM のすべてに比較的親和性が高かった。薬剤添加による総

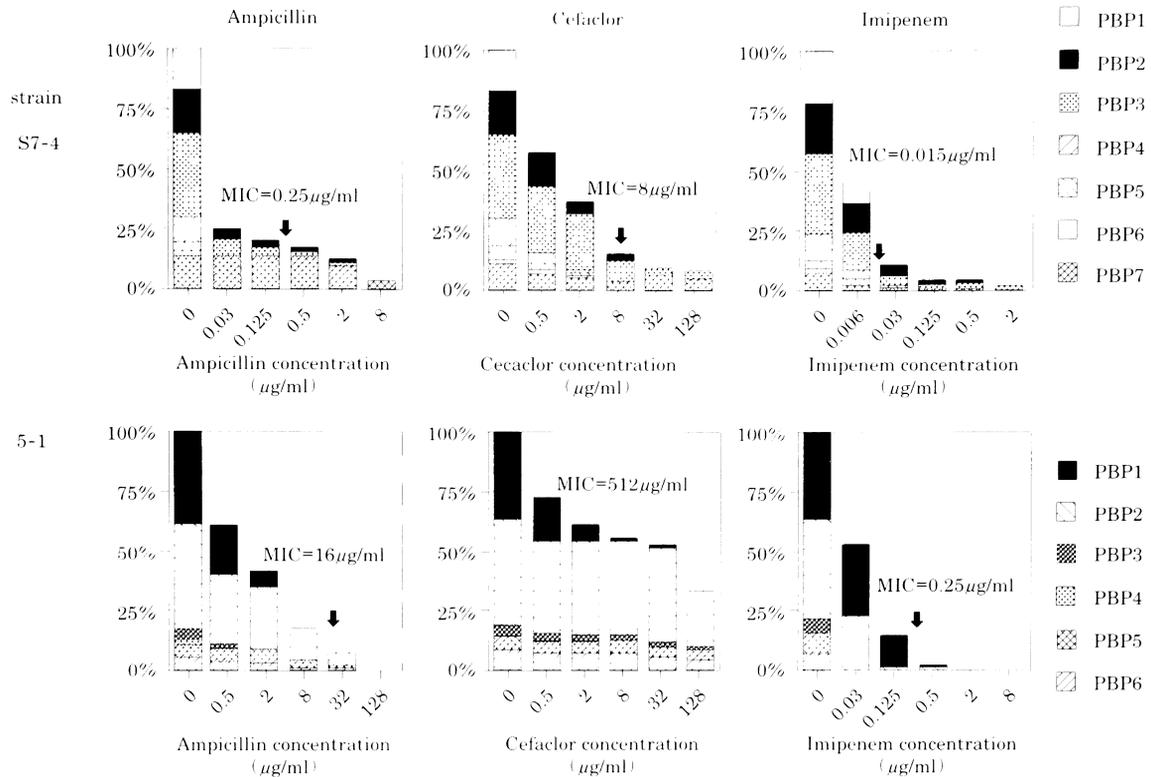


Fig. 4. Reduction (%) of the density of the PBP bands by the addition of various concentrations of ampicillin (ABPC), or cefaclor or imipenem in the ABPC susceptible strain S7-4 and ABPC resistant strains 5-1. The extent of ^3H -PCG binding with each PBP band was visualized by fluorography and measured by densitometer. ↓: MIC value.

PBPs バンドの減弱は耐性株の方が基準菌株および感受性株よりも緩徐であった (Fig. 5)。

5. PCRによる遺伝子背景の検索

1) 16 S-rRNA プライマーを用いた菌種同定

*S. mitis*¹⁶, *S. oralis*¹⁷, *S. sanguis*¹⁸, *S. parasanguis*¹⁸ の 16 S-rRNA 遺伝子配列にもとづき、プライマーを設計した (Table 1)。各基準菌株を用いた PCR では、*S. mitis* は 2 と 3, *S. oralis* は 1 と 2, *S. sanguis* は 4, *S. parasanguis* は 1 の上流プライマーと共通の下流プライマー 16 S-D 1 とでそれぞれ増幅が認められた。これらの基準菌株の結果をもとに分離菌株で同様に PCR を行ったところ、反応性は複雑で、どの菌種の基準菌株とも反応パターンが一致しない株が 132 株中 81 株を占めた。生化学的性状で同定された菌種の基準菌株と同一の反応を示した株は 114 株中 17 株であった (Table 4)。PBPs を検討した *S. parasanguis* の分離株の中では、基準菌株と同じ反応パターン (1 プライマーでのみ増幅) を示したのは ABPC 感受性株の S7-4 株および耐性株の A16-8 株, A21-15 株であり、一方、耐性株の 5-1 株, B12-2 株は *S. oralis* の基準菌株と同様に、2 の両プライマーで、また A16-14 株, A21-7 株は、1, 4 の両プライマーで、それぞれ増幅が認められた。PBPs を検討した *S. mitis* では ABPC 耐性の B22-4-2 株は基準菌株と同じ反応パターン (2,

3 プライマーで増幅) を示したが、感受性株の S-5 株は、2, 3, 4 の 3 種のプライマーに反応した。

2) PCRによるABPC耐性*S. mitis*のPBP2b, 2x遺伝子に関する検討

生化学的性状にて *S. mitis* と同定された分離株の中で、16S-rRNA の 2, 3 プライマーおよび D-Ala-D-Ala ligase 遺伝子の *S. mitis* 同定用プライマーでもともに増幅が確認された 6 株、すなわち ABPC 感受性株 (S-5 株) と耐性株 (B3-5 株, B3-6 株, B3-7 株, B3-8 株, B22-4-2 株) を用い、基準菌株とあわせて PBP2b, 2x 遺伝子に関する検討を行った (Fig. 6)。6 例すべての被験菌株で、PBP2b 遺伝子中の変異頻度の低い領域に設定した上流プライマー Sm 2 B-2 と共通下流プライマー 2 B-D で DNA の増幅 (561 bp) が認められた。一方、PBP2b 遺伝子の resistant block と呼ばれる領域の変異検出用のプライマー、Sm 2 B-1 (増幅領域 240 bp) およびそのすぐ上流と下流に設定した Sm 2 B-3 (増幅領域 284 bp), Sm 2 B-4 (増幅領域 223 bp) では、いずれも基準菌株と S-5 株での DNA の増幅が確認されたが、耐性株 5 株では反応が認められなかった。一方、PBP2x の変異検出用プライマー Sm 2X-U および 2X-D (増幅領域 919 bp) ではすべての株において DNA の増幅がみられた。

Table 2. Inhibition of ³H-PCG binding to PBPs by ampicillin or cefaclor or imipenem in *Streptococcus parasanguis*

Strain	PBP bands	Molecular mass (kDa)	IC ₅₀ (μg/ml)			MIC (μg/ml)		
			ABPC	CCL	IPM	ABPC	CCL	IPM
<i>S. parasanguis</i> ^T ATCC 15912	total		0.0299	0.0814	0.016			
	1	100.7	0.0073	0.078	0.017			
	2	96.0	0.019	0.099	0.012			
	3	92.4	0.042	0.077	0.014	0.125	2	0.03
	4	91.0	0.014	ND (H)	0.0004			
	5	81.1	0.0074	ND (H)	0.021			
	6	44.1	1.597	56.7	0.0005			
S7-4	total		0.0198	1.153	0.0058			
	1	94.5	ND (H)	ND (H)	0.0059			
	2	92.6	0.019	1.186	0.011			
	3	89.5	0.019	4.663	0.0056	0.25	8	0.015
	4	86.7	ND (H)	0.425	0.0046			
	5	85.4	ND (H)	0.402	0.008			
	6	73.7	ND (H)	1.576	0.0041			
A16-8	total		0.418	0.479	0.026			
	1	98.4	0.279	0.410	0.032			
	2	96.0	0.280	0.347	0.018			
	3	93.7	1.106	1.341	0.069	2	4	0.12
	4	89.9	ND (H)	0.786	ND (H)			
	5	84.3	ND (H)	0.353	ND (H)			
	6	42.9	7.77	ND (L)	0.025			
A21-7	total		0.334	1.335	0.020			
	1	98.3	0.273	1.235	0.021			
	2	93.2	0.328	0.50	0.055	4	4	0.25
	3	90.3	ND (H)	2.50	ND (H)			
	4	87.8	ND (H)	ND (H)	ND (H)			
A16-14	total		0.425	0.401	0.0167			
	1	96.1	0.269	0.319	0.017			
	2	92.4	0.285	0.30	0.019			
	3	87.5	ND (H)	ND (H)	ND (H)	4	8	0.25
	4	84.0	ND (H)	ND (H)	ND (H)			
	5	81.1	ND (H)	ND (H)	ND (H)			
B12-2	total		1.254	212.74	0.102			
	1	94.7	0.433	0.434	0.349			
	2	87.6	11.08	782.3	0.129	8	512	0.5
	3	83.5	0.266	0.406	0.084			
	4	43.3	14.96	567.8	0.048			
	5	42.0	8.193	ND (L)	0.041			
5-1	total		1.387	45.38	0.037			
	1	92.4	0.607	0.489	0.093			
	2	86.9	3.867	127.3	0.043	16	512	0.25
	3	83.1	0.357	0.430	0.019			
	4	71.2	ND (H)	ND (H)	ND (H)			
	5	41.1	6.549	643.0	ND (H)			
	6	37.6	6.929	239.5	ND (H)			

IC₅₀, concentration of antibiotic required to decrease the binding of ³H-PCG to PBPs by 50%.

ND, not determined; (H), high affinity PBP; (L), low affinity PBP. T: Type strain.

ABPC: ampicillin, CCL: cefaclor, IPM: imipenem

Table 3. Inhibition of ¹²⁵I-H-PCG binding to PBPs by ampicillin or cefaclor or imipenem in *Streptococcus mitis*

Strain	PBP bands	Molecular mass (kDa)	IC ₅₀ (μg/ml)			MIC (μg/ml)		
			ABPC	CCL	IPM	ABPC	CCL	IPM
<i>S. mitis</i> ^T ATCC 49456	total		0.0059	0.0247	0.00045			
	1	101.5	0.0112	0.074	0.0041			
	2	98.5	0.045	ND (H)	0.0050			
	3	94.3	0.0068	0.398	0.0004	0.03	1	0.03
	4	90.7	0.0286	0.0418	0.0012			
	5	88.4	0.006	0.0213	0.0003			
	6	85.9	ND (H)	ND (H)	ND (H)			
	7	83.6	0.0049	0.041	0.0001			
	8	80.3	0.0063	0.069	0.0036			
S-5	total		0.0059	0.026	0.0011			
	1	94.5	0.013	0.155	0.015			
	2	90.2	ND (H)	0.071	0.0003			
	3	87.5	0.045	0.035	0.0091			
	4	84.4	ND (H)	0.029	ND (H)	0.125	1	0.03
	5	81.9	0.017	0.022	0.0032			
	6	79.5	ND (H)	0.029	0.0003			
	7	76.3	0.045	1.103	0.0043			
	8	40.5	ND (H)	ND (H)	0.0010			
B 3-6	total		0.281	0.345	0.057			
	1	93.9	0.599	1.705	0.077			
	2	82.7	0.389	1.459	0.028	4	128	0.25
	3	79.9	ND (H)	0.934	0.057			
	4	75.6	ND (H)	0.500	ND (H)			
	5	44.2	ND (H)	0.275	0.849			

IC₅₀: concentration of antibiotic required to decrease the binding of ¹²⁵I-H-PCG to PBPs by 50%.

ND, not determined; (H), high affinity PBP. T: Type strain.

ABPC: ampicillin, CCL: cefaclor, IPM: imipenem

Table 4. PCR amplification patterns of 16S-rRNA gene in ampicillin resistant streptococci

Species ^a	number of strains	Typing by PCR of 16S-rRNA gene ^b	number of positive strains
<i>S. parasanguis</i>	76	1 + 1 type	44
		1 + 2 + 4 type	13
		1 type (<i>S. parasanguis</i> ^T type)	12
		1 + 2 type (<i>S. oralis</i> ^T type)	6
		1 type (<i>S. sanguis</i> ^T type)	1
<i>S. oralis</i>	32	1 type (<i>S. sanguis</i> ^T type)	22
		1 + 4 type	7
		2 + 3 + 4 type	2
		1 type (<i>S. parasanguis</i> ^T type)	1
<i>S. mitis</i>	6	2 + 3 type (<i>S. mitis</i> ^T type)	5
		2 + 3 + 4 type	1
unidentified	18	1 + 1 type	5
		3 type	4
		4 type (<i>S. sanguis</i> ^T type)	3
		2 + 3 + 4 type	2
		not amplified	2
		1 + 2 type (<i>S. oralis</i> ^T type)	1
		3 + 4 type	1

^a The isolates were identified by the method of Beighton et al.¹⁾

^b The sequences of primers are shown in Table 1. T: Type strain.

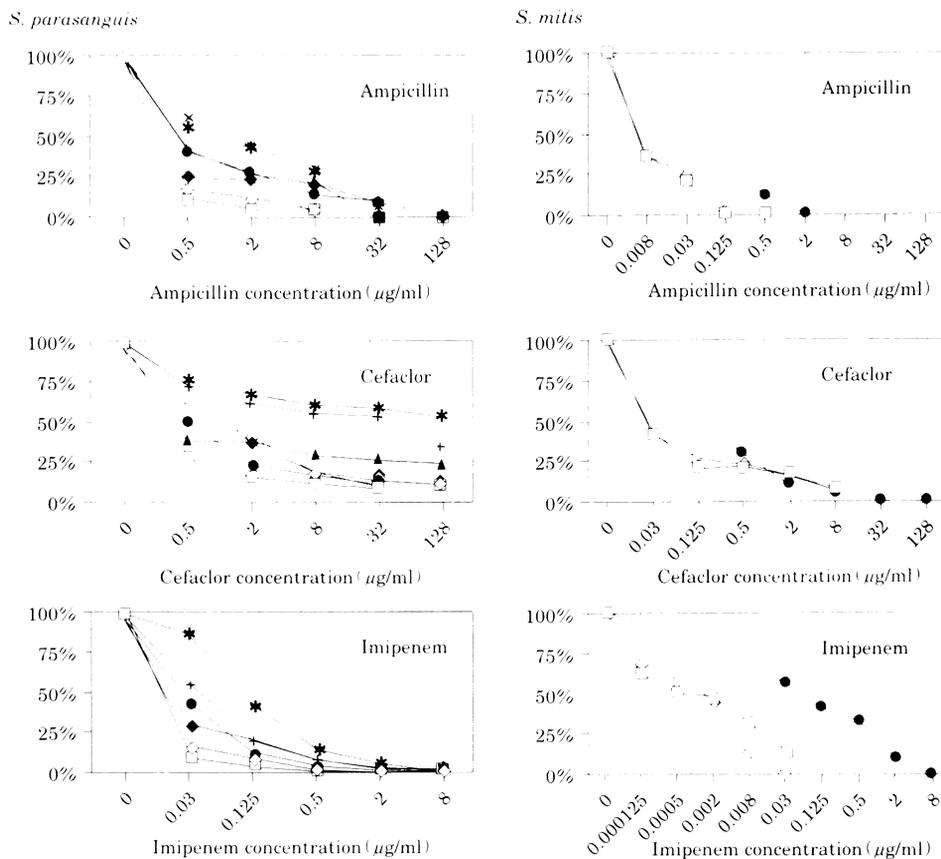


Fig. 5. Reduction (%) of the density of the total PBPs bands by the addition of various concentrations of each β -lactam antibiotic in *Streptococcus parasanguis* and *Streptococcus mitis*. *S. parasanguis*: susceptible strains, (\square) ATCC 10556 (type strain), (\diamond) S7-4; resistant strain, (\bullet) A16-8, (\blacktriangle) A21-7, (\blacklozenge) A16-14, ($*$) B12-2, ($+$) 5-1. *S. mitis*: susceptible strains, (\square) ATCC 49456 (type strain), (\diamond) S-5; resistant strain, (\bullet) B3-6.

III. 考 察

唾液中の ABPC 耐性 streptococci に関する疫学的検討および分離株を用いた β -lactam 薬耐性に関する一連の検討の結果をふまえ、以下に考察を行った。

1. 健康成人唾液中の ABPC 耐性 oral streptococci の検索

S. pneumoniae の PBP 遺伝子変異と関連して oral streptococci の β -lactam 薬耐性は注目されているが¹⁹⁻²¹、耐性株の口腔内での保菌率および総 streptococci 中に占める割合についての報告は少ない²¹。今回、健康成人唾液中の ABPC 耐性 streptococci の検索を ABPC $1\mu\text{g/ml}$ 含有 MSA 平板により行ったところ、74 名中 56 名の被検者より耐性株が検出され、75.7% と高い保菌率を示した。すでに確立された常在菌叢中に外来性の菌が定着することは一般に難しく²¹、また oral streptococci 自体が口腔常在菌叢のもっとも多い菌種の一つであることを考えると、検出された耐性菌株は各個人の常在菌叢中のポピュレーションとして存在している可能性が高いと思われる。

耐性株が総 streptococci 中に占める割合は平均 0.027% で菌数も $2.0 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^4$ cfu/ml 程度であ

り、ABPC 耐性株のポピュレーションは小さいと考えられた。一方、Southall らは、11 人のボランティアに 1 週間ごとに 3 g の amoxicillin を 1 日 2 回投与し、口腔内擦過試料中の耐性 streptococci 数 (MIC $\geq 1\mu\text{g/ml}$) を経時的に測定したところ、実験開始時には全被験者とも耐性菌が検出されていなかったにもかかわらず、amoxicillin 投与を 5 週間継続した時点では耐性菌保菌率が 100% になったと報告している²²。検出菌数に関しては、今回の唾液における検索とは試料採取法が異なるため、比較ができないが、この報告からも、通常は口腔内で非常に少ない耐性菌が、抗菌薬投与により選択あるいは耐性誘導され、増加してくる可能性が高いことが示唆される。 β -lactam 薬の反復投与、特に長期連続投与においては考慮が必要であると思われる。

2. 分離菌株の生化学的性状による菌種同定

分離した ABPC 耐性 streptococci を Beighton らの方法で生化学的性状により同定した結果、*S. parasanguis* が 80 株 (51.9%) ともっとも多く、以下、*S. oralis*、*S. mitis* の順であった。Oral streptococci の β -lactam 薬耐性は *S. mitis*、*S. oralis*、*S. sanguis* に多いといわれるが^{21, 26, 27}、今回の検討では *S. sanguis* は検

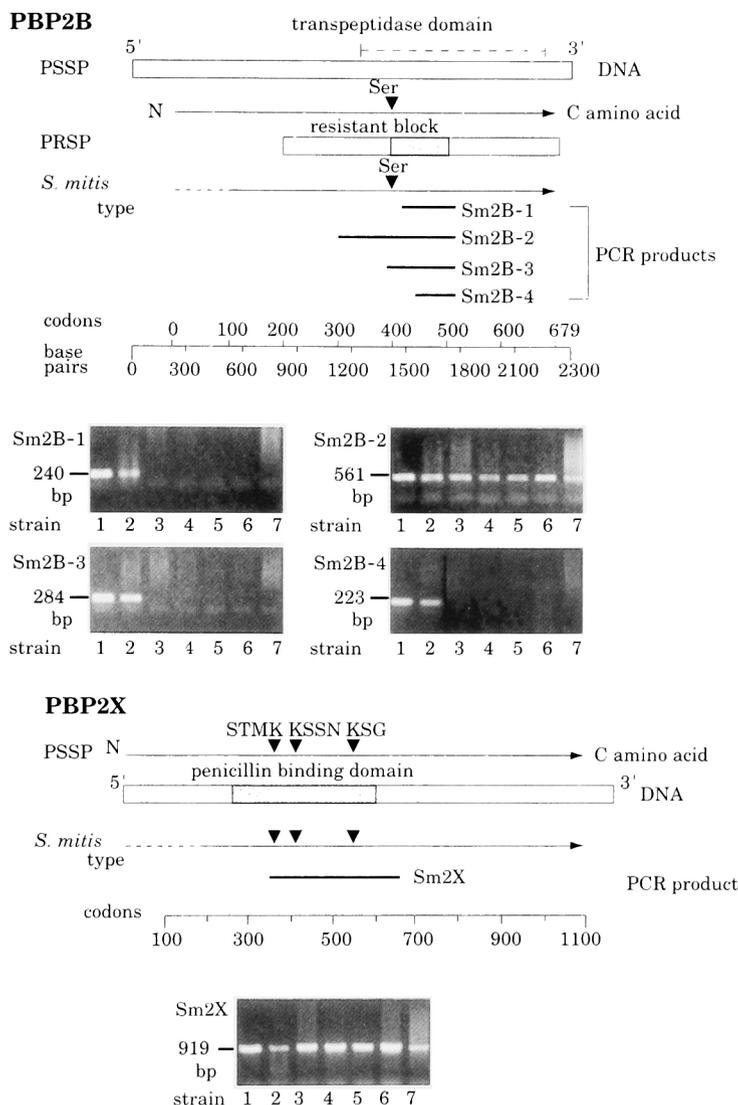


Fig. 6. The results of PCR using primers for PBP 2 b and 2 x genes in *Streptococcus mitis*, lanes 1-2: susceptible strains, 1: type strain, 2: S-5, lanes 3-7: resistant strains, 3: B 3-5, 4: B 3-6, 5: B 3-7, 6: B 3-8, 7: B 22-4-2. Ser: active site serine.

出されなかった。その理由として、試料を唾液としたために *S. sanguis* が分離されにくかったこと、従来 *S. sanguis* とみなされていた菌の一部に *S. parasanguis* が含まれていたことが考えられた。*S. parasanguis* は 1990 年に提唱された菌種で²⁵⁾、16S-rRNA 遺伝子の相同性では *S. sanguis* に最も近縁であるといわれている。また、*S. sanguis* が口腔内では菌面で優勢であるのに対し、*S. parasanguis* は *Streptococcus salivarius*, *S. oralis*, *S. mitis* に次いで、唾液中に比較的多く存在していることが報告されている²⁹⁾。Southall らは amoxicillin resistant oral streptococci として分離された株がすべて菌体外多糖体非産生性の *S. sanguis* であったとしているが²⁵⁾、*S. parasanguis* が菌体外多糖体を産生しない²⁸⁾ 点からみて、これらの耐性株が *S. parasanguis* であった可能性も考えられる。また、本菌種は *S.*

sanguis 同様、感染性心内膜炎の原因菌の一つであり^{30, 31)}、その治療には ABPC が用いられることから、 β -lactam 薬の耐性レベルの上昇については注目すべきであると思われる。

3. ABPC 耐性 streptococci の β -lactam 薬に対する感受性

分離株に対する ABPC, CCL, IPM の MIC 値は、ABPC では 1~16 $\mu\text{g/ml}$ であり、2~4 $\mu\text{g/ml}$ の株が 115 株 (75.3%) を占めたのに対し、CCL では 2~>128 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 3 峰性に分布していた。IPM は ≤ 0.06 ~2 $\mu\text{g/ml}$ の 1 峰性の感受性分布であった。Streptococci では、 β -lactamase 活性は現在まで報告されておらず、今回の分離株でも全株が陰性であった。各株における 3 薬剤の MIC 値は必ずしも平行していなかったが、ABPC の MIC 値が 16 $\mu\text{g/ml}$ の比較的高度

の耐性を示す株では CCL の MIC 値も高値 (>128 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を示し、耐性の重複が認められた。薬剤ごとに各菌株の感受性が異なっていることは、薬剤作用点の差異を反映していると考えられ、個々の薬剤の耐性化はそれぞれ独立に生じたものと思われた。

4. PBP_s バンドパターンと薬剤親和性

次に薬剤耐性機構を検索するため、 β -lactam 薬の作用点である PBP_s について、分離株数の多かった *S. parasanguis*、PBP_s とその遺伝子について比較的報告の多い *S. mitis*²⁴ で検討を行ったが、両菌種の口腔由来感受性株、耐性分離株とも、PBP の数および分子量が基準菌株と完全には一致しなかった。PBP_s バンドパターンは staphylococci²²、enterococci³³ では菌種固有であり同定にも用いられるが、一方で *S. pneumoniae* では、同一血清型の penicillin 感受性株間でもバリエーションがあることが報告されている³⁴。今回の分離株では生化学的性状に加えて、16 S-rRNA 遺伝子タイプが致した株間においても PBP_s バンドパターンは異なっており、したがって、同一の遺伝子的背景を持っている菌株の中でも、バリエーションが存在していると思われた。

被験菌株の総 PBP_s バンドおよび各 PBP バンドに対する ABPC、CCL、IPM の IC₅₀ を competitive assay により算出したところ、個々の PBP との親和性には薬剤ごとに差異が認められ、このことから各薬剤の主要な作用点が異なることが示唆された。また、*S. parasanguis* では、いずれの薬剤においても総 PBP_s バンドの IC₅₀ と MIC とが有意に関連しており、分離株の PBP_s の薬剤親和性の低下が β -lactam 薬の耐性機構であると考えられた。一方、ABPC 耐性 *S. mitis* B3-6 株では、IC₅₀ 値が MIC 値が同程度の *S. parasanguis* に比較して低値であり、特に CCL では MIC が 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であるにもかかわらず、明らかな薬剤低親和性の PBP は確認されなかった。Competitive assay における *S. mitis* の PBP_s バンドの消失は感受性株の場合でも *S. parasanguis* に比べ速やかであり、これらの菌種間では MIC 値と PBP_s の IC₅₀ 値との関係が異なっていることも考えられた。PRSP²⁴ および耐性の *S. mitis*²⁴ では著しい PCG 親和性の低下により fluorography での PBP バンドの検出が困難になるという報告があり、B3-6 株の PBP バンドの総数が感受性株よりも少ない点からも、検出不能の PBP が存在する可能性もあると思われる。

5. PCR による遺伝子背景の検索

1) 16 S-rRNA フライマーを用いた菌種同定

16 S-rRNA 領域の各菌種同定用プライマーを作成し、PCR 法により検索を行ったところ、生化学的性状による同定結果と一致した株は、17 株のみであった。また、基準菌株では見られない PCR の増幅パターンを

示す株が、81 株存在しており、分離株の遺伝子背景が複雑であることが推定された。Oral streptococci では菌種の分類が完全には確定してないが、現時点では、16 S-rRNA 遺伝子の PCR のみで菌種同定を行うことは困難であると考えられた。

2) PCR による ABPC 耐性 *S. mitis* の PBP_{2b}, 2x 遺伝子に関する検討

Oral streptococci の PBP 遺伝子については、*S. mitis* で研究が進んでおり、*S. pneumoniae* 同様、PBP 2b, 2x の変異が耐性化に関与していると報告されている¹⁹⁻²³。そこで今回は、生化学的性状、16 S-rRNA 遺伝子の PCR、D-Ala-D-Ala ligase 遺伝子の PCR の結果がすべて一致した *S. mitis* 分離株を選び、PBP_{2b}, 2x の遺伝子変異に関する検討を行った。*S. pneumoniae* の PBP_{2b} 遺伝子では (Fig. 6) の黒カラムで示す resistant block (nucleotide position 1429-1702) が存在し、PCG 耐性の *S. mitis*、*S. oralis*、*S. sanguis*^{19, 20} とも共通して、変異が起りやすい領域といわれている。この領域内の変異を検索する目的で、3 か所に上流プライマーを設定したが、いずれも増幅が認められたのは感受性株のみで、耐性株における変異が示唆された。一方、*S. pneumoniae* の PBP_{2x} 領域には oral streptococci とアミノ酸配列の相同性がある homology box (STMK, HSSN, KSG) が存在し (Fig. 6)、PRSP および oral streptococci の耐性株ではこれら 3 か所のいずれかに変異が多いと報告されている^{19, 21-23}。今回は STMK box にプライマーを設定し検討したところ、感受性株、耐性株のすべてで DNA が増幅され、変異は確認されなかった。しかし、PBP_{2x} の変異は PRSP においてセフェム耐性に関与するといわれ³⁵、検討した *S. mitis* 分離株では、CCL の MIC が 64~128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と高値であることから、この株の PBP_{2x} 遺伝子については STMK box 以外にも変異の検索を行うべきであると思われた。

IV. おわりに

今回、唾液由来の ABPC 耐性 oral streptococci について、耐性株の健康成人における保菌率、分離された株の菌種同定、耐性 streptococci の PBP_s の β -lactam 薬に対する親和性、PCR による遺伝子背景の検討を行い、考察を試みた。被験菌の個々の PBP との親和性には薬剤ごとに差異があることが認められ、検討した 3 薬剤の主要な作用点が異なることが示唆された。口腔常在菌としてもっとも優勢な oral streptococci の耐性化の傾向および耐性機構を明らかにすることは、その潜在的病原性に加えて、*S. pneumoniae* のペニシリン耐性への関与の点からも重要な意義のあることと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を

賜りました本学第2口腔外科学教室石橋克禮教授ならびに本学細菌学教室藤田浩教授に深甚なる感謝の意を表します。また、御校閲を賜りました本学第1口腔外科学教室瀬戸皖一教授に深謝いたします。さらに、終始懇切なる御指導と御助言、御協力を賜りました本学細菌学教室前田伸子助教授、高尾亜由子助手ならびに大島朋子助手に心より深く感謝の意を表します。本論文の御校閲を賜りました本学第2口腔外科学教室浅田洗一助教授に深謝いたします。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金、基盤研究(B)(2)、課題番号09470461により行われた。

なお、本論文の要旨の一部は第38回歯科基礎医学会(1996年10月12、13日)、第39回歯科基礎医学会(1997年10月1、2日)、第17回日本歯科薬物療法学会(1998年2月27、28日)において発表した。

文 献

- 1) Gehring F J: The genus *streptococcus* and dental diseases. In The prokaryotes (Starr M P, Stolp H, Trüper H G, et al.), p. 1598~1613, Springer-Verlag, Berlin, 1981
- 2) 金子明寛, 佐々木次郎: 口腔常在菌叢とその意義 臨床検査 38: 533~573, 1994
- 3) Lawrence M T, Stephen J M, Maxine A P: General problems in infectious diseases. In Current Medical Diagnosis & Treatment 35th Edition, p.1123~1124, 1996
- 4) 金子明寛: 歯科, 口腔外科領域感染症における起炎菌の変貌と治療. 化学療法の領域 9: 83~91, 1993
- 5) Quinn J P, DiVicenzo C A, Lucks D A, et al.: Serious infections due to penicillin-resistant strains of viridans streptococci with altered penicillin-binding proteins. J. Infect. Dis. 157: 764~769, 1988
- 6) Zito E T, Daneo-Moore L: Transformation of *Streptococcus sanguis* to intrinsic penicillin resistance. J. Gen. Microbiol. 134: 1237~1249, 1988
- 7) Faber B F, Eliopoulos G M, Ward J I, et al.: Multiply resistant viridans streptococci: susceptibility to β -lactam antibiotics and comparison of penicillin-binding protein patterns. Antimicrob. Agents Chemother. 24: 702~705, 1983
- 8) Dowson C G, Coffey T J, Kell C, et al.: Evolution of penicillin resistant in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. Mol. Microbiol. 9: 635~643, 1993
- 9) Reichmann P, König A, Linsres J, et al.: A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. J. Infect. Dis. 176: 1001~1012, 1997
- 10) Hakenbeck R, König A, Kern I, et al.: Acquisition of five high-*M*. penicillin-binding protein variants during transfer of high-level β -lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 180: 1831~1840, 1998
- 11) Lawrence M T, Stephen J M, Maxine A P: Anti-infective chemotherapeutic & antibiotic agents. p. 1348~1351, Current Medical Diagnosis & Treatment 35th Edition, p. 1348~1351, 1996
- 12) Beighton D, Hardie J M, Whiley R A: A scheme for the identification of viridans streptococci. J. Med. Microbiol. 35: 367~372, 1991
- 13) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1993): 微量液体希釈法による MIC 測定法(日本化学療法学会標準法)の一部修正. Chemotherapy 41: 184~186, 1993
- 14) Usui H: Study of β -lactam antibiotic susceptibilities and characteristics of penicillin-binding proteins from *Streptococcus anginosus*, *S. constellatus* and *S. intermedius*. J. Infect. Chemother. 2: 222~231, 1996
- 15) Garnier F, Gerbaud G, Courvalin P, et al.: Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. J. Clin. Microbiol. 35: 2337~2341, 1997
- 16) Kawamura Y, Hou X G, Sultana F, et al.: Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45 (2): 406~408, 1995
- 17) Bentley R W, Leigh J A, Collins M D: Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 41 (4): 487~494, 1991
- 18) Whiley R A, Fraser H Y, Douglas C W I, et al.: *Streptococcus parasanguis* sp. nov., an atypical viridans streptococcus from human clinical specimens. FEMS Microbiol. Lett. 68: 115~122, 1990
- 19) Dowson C G, Hutchison A, Woodford N, et al.: Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 5858~5862, 1990
- 20) Potgieter E, Chalkley L J: Relatedness among penicillin-binding protein 2b genes of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus pneumoniae*. Microbial Drug Resistance 1: 35~42, 1995
- 21) Laible G, Spratt B G, Hakenbeck R: Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Molecular. Microbiol. 5: 1993~2002, 1991
- 22) Krauß J, Linden M, Grebe T, et al.: Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP targets in *Streptococcus pneumoniae*. Microbial Drug Resistance 2: 183~186, 1996
- 23) Sibold C, Henrichsen J, König A, et al.: Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. Mol. Microbiol. 12: 1013~1023, 1994
- 24) Woodman A J, Vidic J, Newman H N, et al.: Effect of repeated high dose prophylaxis with amoxicillin on the resident oral flora of adult volunteers.

- J. Med. Microbiol. 19: 15~23, 1985
- 25) Southall P J, Mahy N J, Davies R M, et al.: Resistance in oral streptococci after repeated two-dose amoxicillin prophylaxis. J. Antimicrob. Chemother. 12: 141~146, 1983
- 26) Alcaide F, Liñares J, Pallares R, et al.: In vitro activities of 22 β -lactam antibiotics against penicillin resistant and penicillin susceptible viridans group streptococci isolated from blood. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2243~2247, 1995
- 27) Doern G V, Ferraro M J, Brueggemann A B, et al.: Emergence of high rates of antimicrobial resistance among viridans group streptococci in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 891~894, 1996
- 28) Whiley R A, Fraser H Y, Douglas C W I, et al.: *Streptococcus parasanguis* sp. nov., an atypical viridans *Streptococcus* from human clinical specimens. FEMS Microbiol. Lett. 68: 115~122, 1990
- 29) Lucas V S, Beighton D, Roberts G J, et al.: Changes in the oral streptococcal flora of children undergoing allogenic bone marrow transplantation. J. Infect. 35: 135~141, 1997
- 30) Curley D B, Wells V, Viscount H, et al.: FimA, a major virulence factor associated with *Streptococcus parasanguis* endocarditis. Infect. Immun. 63: 4669~4674, 1995
- 31) Oligino L, Taylor P F: Overexpression and purification of a fimbria-associated adhesin of *Streptococcus parasanguis*. Infect. Immun. 61: 1016~1022, 1993
- 32) Pierre J, Gutmann L, Bornet M, et al.: Identification of coagulase-negative staphylococci by electrophoretic profile of total proteins and analysis of penicillin-binding proteins. J. Clin. Microbiol. 28: 443~446, 1990
- 33) Williamson R, Gutmann L, Horaud T, et al.: Use of penicillin-binding proteins for the identification of enterococci. J. Gen. Microbiol. 132: 1929~1937, 1986
- 34) Hakenbeck R, Briese T, Chalkley L, et al.: Variability of penicillin-binding proteins from penicillin-sensitive *streptococcus pneumoniae*. J. Infect. Dis. 164: 307~312, 1991
- 35) König A, Reinert R R, Hakenbeck R: *Streptococcus mitis* with unusually high level resistance to β -lactam antibiotics. Microbial Drug Resistance 4: 45~49, 1998
- 36) 紺野昌俊, 生方公子: PRSP におけるペニシリン セフェム系薬耐性機構。ペニシリン耐性肺炎球菌(紺野昌俊, 生方公子, ペニシリン耐性肺炎球菌研究会編) p.83~98, 協和企画通信, 東京, 1997

Study on β -lactam antibiotic susceptibilities and characteristics of penicillin binding proteins of ampicillin resistant streptococci isolated from healthy adults' saliva

Fumihiko Sasaki

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tsurumi University School of Dental Medicine (Chief: Prof. Katsunori Ishibashi), 2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501, Japan

Ampicillin (ABPC) resistant streptococci in healthy adults' saliva were screened using Mitis-Salivarius agar plates which contained 1 μ g/ml ABPC, and the screen test revealed that 56 out of 74 volunteers (75.4%) retained the resistant strains. The streptococcal isolates (154 strains) were identified as *Streptococcus parasanguis* (80 strains; 51.9%), *Streptococcus oralis* (33 strains; 21.4%), and *Streptococcus mitis* (7 strains; 4.5%) by biochemical characteristics. The MIC values of ABPC, cefaclor (CCL), and imipenem (IPM) against the isolates ranged as follows: 1-16 μ g/ml for ABPC, 2->128 μ g/ml for CCL, and \leq 0.06-2 μ g/ml for IPM; these values did not necessarily show proportionate distribution between each other. In both *S. parasanguis* and *S. mitis*, the numbers and molecular sizes of penicillin binding proteins (PBPs) varied among strains belonging to the same species, even among strains with the same amplification patterns of the 16S-rRNA gene, when examined by polymerase chain reaction (PCR) method. Although the binding affinity for each PBP of the isolates was diverse among the three β -lactams, a correlation between the IC₅₀ value for total PBPs and the MIC value was observed for all three. The gene detection in the conserved region of PBP2b and 2x by means of PCR indicated the possibility of alteration, at least in the PBP2b gene of *S. mitis* resistant strains. These results suggest that the β -lactam-resistant population of streptococci may universally exist in the healthy oral cavity, and that they may be important because of their own latent pathogenicity and potential resistant gene source of *Streptococcus pneumoniae*.