

口腔内より分離した *Haemophilus* 属菌

本田 寿子 田近 志保子 浜田 育男
柳原 敬 金子 克

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座* (主任: 金子 克教授)

[受付: 1982年9月21日]

抄録: ヒト上気道に常在する菌として知られている *Haemophilus* 属菌の口腔内における実態を明らかにする目的で健康な成人38名の唾液と歯垢からの分離を試み、その分離株について生化学的性状による分類と薬剤感受性について検討したので報告する。

38名の唾液、歯垢中の *Haemophilus* 属菌の菌量はそれぞれ平均 6.6×10^6 /ml, 6.0×10^5 /gであった。分離した316株を生化学的性状に従って分類した結果, *H. influenzae* は11株で biotype I ~ V型が分離され, VI型は分離されず, いずれも唾液からのみ分離された。*H. parainfluenzae* は229株で全体の72.4%であり, biotype 別にみるとI型173株(75.5%), III型38株(16.6%)が唾液と歯垢の両方から, II型18株(7.9%)は唾液からのみ分離された。*H. aphrophilus* 5株は歯垢からのみ分離され, *H. paraphrophilus* 64株は唾液と歯垢から分離された。また *H. parahaemolyticus* 7株は唾液からのみ分離された。

各検体から分離された *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. parahaemolyticus* を含む101株についてペニシリン系薬剤6剤, セフェム系薬剤8剤, アミノグリコシド系薬剤2剤, マクロライド系薬剤1剤, テトラサイクリン系薬剤2剤と Chloramphenicol の計20剤を用い, 最小発育阻止濃度を測定した。その結果ペニシリン系6剤のうち, PCG はやや抗菌力が劣り, 他の合成ペニシリン系5剤, なかでも PIPC, APPC, MZPC は優れた抗菌力を示した。セフェム系8剤のうち CZX は $0.05 \mu\text{g/ml}$ にピークがあり, 最も強い抗菌力を示した。

また PCG, ABPC, SBPC, CXM, CZX, CMX, CEX, CCL, CMZ に $\text{MIC} \geq 100 \mu\text{g/ml}$ の高度耐性を示す株がみられ, そのうちペニシリン系耐性株に β -lactamase 産生を確認した。

緒 言

Haemophilus 属菌はヒト上気道の常在菌として知られており, 主に *H. influenzae* とその感染症を中心に研究が行われてきた。

とくに口腔内の *Haemophilus* 属菌については Sims¹⁾ が健康なヒト唾液中の *Haemophilus* について報告しており, 疾患との関係についても口腔内に多くみられる *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. parahaemolyticus* が心内膜炎²⁾, 歯周炎³⁾, 歯肉炎⁴⁾などの起炎菌として報告されている。

こうした *Haemophilus* 属菌と疾患の関連を

検討することを目的として健康な成人の唾液と歯垢からの分離を試み, さらに生化学的性状による分類と薬剤感受性試験を行ったので報告する。

実 験 方 法

1. 材 料

健康な成人38名の唾液と歯垢76検体を用いた。唾液は滅菌シャーレに, 歯垢はペプトン水1mlに無菌的に採取した。

2. 培 地

分離用チョコレート寒天培地〔Trypticase soy agar (BBL) 1000ml, hemoglobin 10g,

Haemophili in the human oral cavity.

Hisako HONDA, Shihoko TAJIKI, Ikuo HAMADA, Takashi YANAGIHARA and Masaru KANEKO

(Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通り1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 7: 219-227, 1982

NAD 10mg, Bacitracin 300mg], ペプトン水 (Bact-peptone 2g, tween 80 8ml, 精製水 1000ml), Trypticase soy broth [(BBL), 以下 TS-broth と略す], 血液寒天培地 (TS-agar 1000ml, 馬脱線維血球 50ml), Porphyrin 培地 (δ -aminolevulinic acid hydrochloride 335.6g, MgSo₄ 96.31g, 1/15M phosphate buffer 1000ml), Ornithine-decarboxylase 培地 (Møller 培地, peptone pepsin 5.0g, beef extract 5.0g, glucose 0.5g, 1.6% bromocresol purple ethanol solution 0.625ml, 0.2% cresol red solution 2.5ml, pyridoxal 5.0mg, 精製水 1000ml), Indole 培地 (L-tryptophane 1g, 1/15M phosphate buffer 1000ml, hemin 10mg, NAD 10mg), Urease 培地 (K₂HPO₄ 1g, NaCl 5g, phenol red 0.1mg), 糖分解用基礎培地 [phenol red broth base (Difco) 1000ml, hemin 10mg, NAD 10mg], 感受性測定用ブイヨン (変法ミュラーヒントンブイヨン, ニッスイ), 感受性測定用寒天培地 (変法ミュラーヒントン培地, ニッスイ)。

3. 培養

培養はすべて35°C, ローソク培養で行った。ただし薬剤感受性試験は35°C, 好気性培養で行った。

4. *Haemophilus* 属菌の分離, 同定と定量

1) 分離と定量: 無菌的に採取した唾液とミキサーを用い均一にした歯垢を材料とし, ペプトン水で10倍階段希釈した。唾液は10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵希釈段階のもの, 歯垢は10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴のもの, それぞれ0.1mlを分離用チョコレート寒天培地に滴下し, コンラージ棒で塗布した。

2) 同定: 分離用チョコレート寒天培地に発育した *Haemophilus* 様コロニーを1平板から5コずつ釣菌し, グラム染色で形態を確認した。X, V因子要求性は TS-broth に hemin 10 μ g/ml, NAD 10 μ g/ml を単独にあるいは両者を加えた培地中での発育の有無で判定する試験管法で行った。

5. 生化学的性状検査

性状検査に用いた前培養はすべて TS-broth

に hemin 10 μ g/ml, NAD 10 μ g/ml を加えたものを用いた。1) 溶血性: 血液寒天培地に前培養菌を接種し, 24時間培養後, 発育し溶血がみられたものを陽性とした。2) CO₂ 要求性: 5% CO₂ 培養と好気性培養の2方法で24時間培養後, CO₂ 培養でのみ発育したものを陽性とした。3) Porphyrin test: Porphyrin 培地に前培養菌1白金耳を接種し, 24~48時間培養後, 暗室にて Wood's light (360nm) を照射し, 橙赤蛍光色を呈したものを陽性とした。4) Ornithine-decarboxylase test^{5,6,7)}: Ornithine-decarboxylase 培地に前培養菌1白金耳を接種し, 24~48時間培養後, 培養液が紫色に変わったものを陽性とした。5) Indole 産生性^{5,6)}: Indole 培地に前培養菌を1白金耳接種し, 24時間培養後, Kovac の試薬1滴を滴下し, 培養液上層部が赤色に変わったものを陽性とした。6) Urease test: Urease 培地に前培養菌1白金耳を接種し, 24時間培養後, 培養液が赤色に変わったものを陽性とした。7) Oxidase test: Kovac の方法⁸⁾に従い, 1% tetramethylparadiamine dihydrochloride solution をろ紙に1滴しみこませ, その上に平板培地に培養した菌を白金耳で塗り, 5~10秒後に暗紫色に変わったものを陽性とした。8) Catalase test: 3% H₂O₂ を白金耳で1滴スライドグラスにのせ, 前培養菌1白金耳と混ぜ, 気泡が生じたものを陽性とした。9) 糖分解性^{5,6)}: 糖分解用基礎培地に D-glucose, Sucrose, Lactose を1%に加えて用い, 前培養菌1白金耳を接種し, 7日間観察して, 培養液が黄色に変わったものを陽性とした。

6. 薬剤感受性試験

1) 供試菌株: 38名から分離した *H. influenzae* 11株, *H. parainfluenzae* 59株, *H. aphrophilus* 4株, *H. paraphrophilus* 22株 *H. parahaemolyticus* 5株の計101株。

2) 培地: 化学療法学会測定法⁹⁾に基づき, 増菌用には hemin 10 μ g/ml, NAD 10 μ g/ml を加えた感受性測定用ブイヨンを用い, 平板培地は感受性測定用寒天培地に hemoglobin 10mg/ml, NAD 10 μ g/ml を加えたチョコレート寒天

培地を用いた。

3) 使用薬剤: ペニシリン系薬剤として Benzylpenicillin(PCG), Ampicillin (ABPC), Sulbencillin (SBPC), Piperacillin (PIPC), Apalcillin(APPC), Mezlocillin(MZPC), セフェム系薬剤として Cephaloridine (CER), Cefuroxime (CXM), Ceftizoxime (CZX), Cefmenoxime (CMX), Cephalexin (CEX), Cefaclor(CCL), Latamoxef(LMOX), Cefmetazole (CMZ), アミノグリコシド系薬剤として Amikasin (AMK), Sisomicin (SISO), マクロライド系薬剤として Erythromycin(EM), テトラサイクリン系薬剤として Tetracycline (TC), Minocycline (MINO)と Chloramphenicol (CP) の計20剤。

4) 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定⁹⁾: 増菌した菌液を感受性測定用ブイヨンにて 10^6 CFU/mlに調整し, ミクロプランター(佐久間)を用い, $5 \mu\text{g}$ ずつ接種し, 35°C , 24時間培養後, MICを測定した。

7. β -lactamase 産生性

1) 供試菌株: *H. influenzae* 分離株11株とペニシリン系薬剤 PCG, ABPC, SBPC, セファロスポリン系薬剤 CEX, CCL に $\text{MIC} \geq 25 \mu\text{g/ml}$ の低感受性を示した *H. parainfluenzae* 20株, *H. aphrophilus* 4株, *H. paraphrophilus* 7株の計42株を用いた。

2) 試験法: PCGを基質とした β -lactamase detection paper (Oxoid)を精製水で湿らせ, Bacitracin を入れないチョコレート寒天培地に培養した菌を塗抹し, 5分後に paperの色が紫色から黄色に変わったものを β -lactamase 陽性とした。

成 績

1. 唾液, 歯垢中の *Haemophilus* 属菌の菌量
38名の唾液, 歯垢を定量培養し, その菌量を調べた(表1)。唾液中の *Haemophilus* 属菌は $4 \sim 200 \times 10^4/\text{ml}$ で平均 $6.6 \times 10^6/\text{ml}$, 歯垢中の *Haemophilus* は $4 \sim 260 \times 10^3/\text{g}$ で平均 $6.0 \times 10^5/\text{g}$ であった。

Table 1. Summary of viable counts of *Haemophilus* in saliva and dental plaque

Count*	No. of subjects	
	Saliva	Dental plaque
4- 5	1	1
5- 10	4	5
11- 20	1	2
21- 30	0	3
31- 40	2	1
41- 50	2	2
51- 60	7	4
61- 70	3	3
71- 80	5	5
81- 90	3	6
91-100	5	1
101-200	5	4
201-260	0	1

*: $\times 10^4/\text{ml}$ in saliva and $\times 10^3/\text{ml}$ in dental plaque

Mean count	
Saliva ($\times 10^4/\text{ml}$)	Dental plaque ($\times 10^3/\text{g}$)
658	602

2. 分離菌株の性状

38名の唾液と歯垢から分離した316株の *Haemophilus* 属菌について生化学的性状による分類を試みた^{6,7)}。*H. influenzae* は11株 (3.5%)で biotype 別にみると I型4株, II型2株, III型1株, IV型3株, V型1株でVI型は分離されなかった。*H. parainfluenzae* は229株で全体の72.4%であり, biotype 別では I型173株 (75.5%), II型18株 (7.9%), III型38株 (16.6%)で I型が圧倒的に多かった。また *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. parahaemolyticus* もそれぞれ5株 (1.6%), 64株 (20.3%), 7株 (2.2%)分離された。その他の *Haemophilus* 属菌と *Haemophilus* 属菌に類似の *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* は分離されなかった。

3. 唾液, 歯垢中の *Haemophilus* 属菌

Haemophilus 属菌が唾液と歯垢にどのように分布しているかをみると (表3), *H. influ-*

Table 2. Characteristics of *Haemophilus* species isolates (316 strains)

Species	No. of strains	Haemolysis	Hemin-requirement	NAD-requirement	δ -ALA	Indole	Ornithine-decarboxylase	Urease	Oxidase	Catalase	D-Glucose, acid	Sucrose, acid	Lactose, acid	CO ₂ enhances growth
<i>H. influenzae</i>	11													
biotype I	4	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
biotype II	2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
biotype III	1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
biotype IV	3	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
biotype V	1	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	229													
biotype I	173	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
biotype II	18	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
biotype III	38	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)
<i>H. paraphrophilus</i>	64	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	(+)
<i>H. parahaemolyticus</i>	7	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-

(+) : weak reaction

enzae は唾液からのみ分離され、*H. parainfluenzae* の I 型と III 型は唾液と歯垢の両方から、II 型は唾液からのみ分離された。また *H. aphrophilus* は唾液からは分離されず、歯垢からの

Table 3. Assignment of *Haemophilus* strains in saliva and dental plaque

Species	Saliva	Dental plaque
<i>H. influenzae</i>	11	0
biotype I	4	0
biotype II	2	0
biotype III	1	0
biotype IV	3	0
biotype V	1	0
<i>H. parainfluenzae</i>	121	108
biotype I	84	89
biotype II	18	0
biotype III	19	19
<i>H. aphrophilus</i>	0	5
<i>H. paraphrophilus</i>	34	30
<i>H. parahaemolyticus</i>	7	0
Total	173	143

み分離され、これと対照的に *H. parahaemolyticus* は唾液からのみ分離され、*H. paraphrophilus* は唾液、歯垢いずれからも分離された。

4. 検体別にみた *Haemophilus* 属菌の分布

38名の唾液と歯垢から分離された *Haemophilus* 属菌の菌種をみると表4のように、1菌種のみ *Haemophilus*、すなわち平板培地に、発育したコロニーがすべて同じ菌種だったものは2名のみで、他は2菌種から6菌種にわたる異なった菌種の *Haemophilus* が同一人の唾液と歯垢から分離された。また *H. influenzae* や *H. parahaemolyticus* 4名からしか分離されなかったのに対し、*H. parainfluenzae* のうち特に biotype I 型は36名 (94.7%) から分離された。

5. 薬剤感受性試験

表5にみられるように、ペニシリン系薬剤6剤のうちPCGは0.78 μ g/mlにピークがあり、やや抗菌力が劣るが、他の5剤、中でもPIPC、APPC、MZPCが優れた抗菌力を示している。

Table 4. Assignment of *Haemophilus* isolates from saliva and dental plaque

Species \ No. of subjects	2	12	4	2	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2	1	1	1
<i>H. influenzae</i>															s	s	
biotype I																	
biotype II																s	s
biotype III																	s
biotype IV																	s
biotype V														s			
<i>H. parainfluenzae</i>	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p	s, p
biotype I																	
biotype II						s	s				s		s	s			s
biotype III			s, p		s, p	s, p		s, p	s, p		s, p		s, p	s, p			s, p
<i>H. aphrophilus</i>		p														p	p
<i>H. paraphrophilus</i>				s, p	s, p		s, p		s, p	s, p	s, p	s, p	s, p				s, p
<i>H. parahaemolyticus</i>								s		s				s			

s : *Haemophilus* isolated from saliva p : *Haemophilus* isolated from dental plaque

セファロスポリン系の注射剤 CER, CXM, CZX, CMX のうち CZX は 0.05 µg/ml で 76% の菌株の発育を阻止し、最も強い抗菌力を示した。また CXM, CMX もそれぞれ 0.39 µg/ml,

0.2 µg/ml にピークをもち優れた抗菌力を示した。これに対してセファロスポリン系経口剤 CEX, CCL はいずれも 12.5 µg/ml にピークをもち低感受性であった。オキサセフェム系の

Table 5. Sensitivity of *Haemophilus* for antibiotics (101 strains)

Antibiotics	MIC (µg/ml)																
	0.0063	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
PCG	3			1			5	53	16	14	2	1				6	
ABPC						2	43	42	8				1	4		1	
SBPC						28	12	25	26		6		2		2		
PIPC	32	33	6	8	10	3	2	1	1	3	2						
APPC			43	30	18	9	1										
MZPC	41	30	10	15		2	3										
CER						5	9	23	58	4	2						
CXM				5	17	48	30									1	
CZX		26	51	16	6											1	
CMX				7	44	33	8	5				3				1	
CEX										7	44	30	3	1	1	1	
CCL										18	54	22	6	2	1	1	
LMOX						3	38	15	30	11	2	2					
CMZ					5	1	4	44	44	1						1	
AMK							31	13	37	14	6	1	6				
SISO				5		7		58	28	3							
EM						5	1	43	1	7	24	12	8				
TC							31	53	16							1	
MINO		2	1	2		4	37	32	10	10		3					
CP				5	13	19	5	47	8		4						

The number written in Gothic is the maximum value of MIC for each antibiotics.

LMOX は0.78 μ g/mlにセフマイシン系薬剤
CMZ は1.56 μ g/mlにピークがあった。アミノ
グリコンド系の AMK と SISO は3.13 μ g/ml,
1.56 μ g/mlにピークがあり, EM, MINO, TC,
CP は1.56 μ g/ml, 1.56 μ g/ml, 0.78 μ g/ml,
1.56 μ g/ml にピークを示した。MIC \geq 100 μ g/
mlの高度耐性株が PCG で6株, ABPCで1株,
SBPCで2株, またセフェム系の CXM, CZX,

CMX, CMZ で1株ずつ, CEX で2株, CCL
で3株みられた。

菌種別の MIC 分布をみるとほぼ同様の感受
性パターンを示したがペニシリン系薬剤に対し
てMIC \geq 100 μ g/mlを示す高度耐性菌は *H. in-*
fluenzae, *H. parainfluenzae*, *H. aphroph-*
ilus にみられた。一方セフェム系薬剤にMIC \geq
100 μ g/mlを示す高度耐性菌は *H. parainflue-*

Table 6. Sensitivity for antibiotics of 7 β -lactamase and 27 non- β -lactamase producing *Haemophilus* species

Strain number	Species	β -lactamase	PCG	ABPC	SBPC	CXM	CZX	CMX	CEX	CCL	LMOX	CMZ
17	<i>H. aphrophilus</i>	+	>100*	50	6.25	0.39	0.05	3.13	25	12.5	25	3.13
24	<i>H. aphrophilus</i>	+	>100	50	6.25	0.39	0.05	12.5	12.5	12.5	12.5	3.13
32	<i>H. aphrophilus</i>	+	>100	25	6.25	0.39	0.10	12.5	12.5	25	25	3.13
33	<i>H. aphrophilus</i>	+	>100	50	6.25	0.39	0.05	12.5	25	25	12.5	3.13
48	<i>H. influenzae</i>	+	12.5	50	6.25	0.20	0.05	0.39	12.5	25	12.5	3.13
119	<i>H. influenzae</i>	+	>100	>100	100	0.39	0.05	0.39	12.5	12.5	12.5	6.25
65	<i>H. parainfluenzae</i>	+	>100	0.39	0.20	0.39	0.05	0.39	12.5	12.5	12.5	3.13
154	<i>H. influenzae</i>	-	3.13	0.39	0.20	0.39	0.025	0.78	25	12.5	6.25	3.13
163	<i>H. paraphrophilus</i>	-	0.78	1.56	1.56	0.39	0.10	0.20	25	25	6.25	3.13
197	<i>H. paraphrophilus</i>	-	0.78	0.78	0.78	0.78	0.05	0.20	25	25	6.25	3.13
223	<i>H. paraphrophilus</i>	-	0.78	0.78	0.78	0.78	0.05	0.20	25	25	6.25	3.13
226	<i>H. paraphrophilus</i>	-	0.39	0.78	0.78	0.78	0.025	0.39	25	25	3.13	3.13
249	<i>H. paraphrophilus</i>	-	0.78	0.78	1.56	0.39	0.025	0.39	25	25	3.13	1.56
280	<i>H. paraphrophilus</i>	-	0.78	0.39	1.56	0.78	0.05	0.20	12.5	25	3.13	1.56
297	<i>H. paraphrophilus</i>	-	0.78	0.78	0.78	0.78	0.20	0.20	12.5	25	3.13	3.13
9	<i>H. parainfluenzae</i>	-	1.56	1.56	25	>100	>100	100	>100	100	25	>100
64	<i>H. parainfluenzae</i>	-	1.56	1.56	25	50	50	25	50	100	6.25	100
157	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	0.78	0.39	0.05	0.78	25	12.5	3.13	1.56
163	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	0.78	0.39	0.05	0.20	25	12.5	3.13	1.56
169	<i>H. parainfluenzae</i>	-	1.56	0.78	1.56	0.78	0.05	0.20	25	25	6.25	3.13
182	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	1.56	0.78	0.025	0.20	25	25	3.13	1.56
201	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	0.78	0.39	0.025	0.39	25	25	3.13	1.56
208	<i>H. parainfluenzae</i>	-	1.56	0.39	0.78	0.39	0.05	0.39	25	25	3.13	1.56
224	<i>H. parainfluenzae</i>	-	1.56	0.39	0.78	0.39	0.05	0.20	25	25	3.13	1.56
233	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	0.78	0.39	0.05	0.20	25	25	3.13	1.56
239	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	0.78	0.39	0.05	0.20	25	12.5	3.13	1.56
266	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	1.56	0.78	0.10	0.39	25	25	6.5	1.56
271	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	1.56	0.39	0.025	0.39	25	25	6.25	1.56
277	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	0.78	0.39	0.025	0.39	25	12.5	6.25	1.56
282	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	1.56	0.39	0.05	0.20	50	100	3.13	1.56
289	<i>H. parainfluenzae</i>	-	1.56	0.78	1.56	0.39	0.05	0.20	25	25	6.25	1.56
300	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.78	1.56	0.78	0.10	0.20	25	25	6.25	1.56
307	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	1.56	0.78	0.10	0.39	25	25	6.25	1.56
311	<i>H. parainfluenzae</i>	-	0.78	0.39	1.56	0.78	0.025	0.39	25	25	6.25	1.56

* MIC in μ g/ml

Table 7. Correlation between β -lactamase and sensitivity for ampicillin of *H. influenzae*

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	No. of strains	β -lactamase
≤ 1.56	8	-
≥ 1.56	3	+

zae にもみられた。*H. parahaemolyticus* には高度耐性菌がみられなかった。

6. β -lactamase 産生性

ペニシリン系, セファロスポリン系薬剤に対して MIC $\geq 25\mu\text{g/ml}$ を示した *H. influenzae* 3株, *H. parainflunzae* 20株, *H. aphrophilus* 4株, *H. paraphrophilus* 7株, 計34株の β -lactamase 産生とその MIC を示した (表6)。PCG に MIC $\geq 100\mu\text{g/ml}$ を示した *H. influenzae* 1株, *H. parainfluenzae* 1株, *H. aphrophilus* 4株と ABPC に MIC が $50\mu\text{g/ml}$ の *H. influenzae* 1株, 計7株が β -lactamase を産生した。一方, CEX, CCL に MIC $\geq 12.5\mu\text{g/ml}$ を示した27株は β -lactamase を産生しなかった。また分離した *H. influenzae* 11株について β -lactamase 産生を調べたところ (表7), ABPC に MIC, $1.56\mu\text{g/ml}$ の1株, MIC $\geq 50\mu\text{g/ml}$ 2株, 計3株が β -lactamase を産生し, MIC $\leq 1.56\mu\text{g/ml}$ の8株は β -lactamase を産生しなかった。

考 察

Haemophilus 属菌は上気道に常在する細菌の1つであるが, 最近の研究ではヒト口腔内に一定の割合で見出されるといわれている。Sims¹⁾, Killian ら¹⁰⁾, 佐々木ら¹¹⁾は唾液中には $3 \times 10^7/\text{ml}$, 歯垢にはその $1/3 \sim 1/10$ 以下と報告している。私たちの今回の成績ではやや低い率になっているが, 対象とした健康な成人38名すべてから分離でき, 口腔内の正常細菌叢の1つと考えられる。

分離した *Haemophilus* 属菌を生化学的性状^{5,6,7)}に基づいて分類したが, 口腔内から分離される^{10,11)}といわれる *H. segnis* と *H. paraisuis* は分離されなかった。また形態や性状など

で *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* と類似点の多い *Actinobacillus actinomycetemcomitans* および *Eikenella corrodens* は Indole, Catalase, Oxidase, Ornithine-decarboxylase, 糖分解性で識別できるが, 私たちの今回の実験では分離されなかった。

Killian ら¹¹⁾は唾液中には *H. parainfluenzae* が多く, *H. aphrophilus* は全くみられず, *H. influenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. segnis* がわずかにみられた。一方歯垢中には *H. parainfluenzae* が殆どどの検体から分離され, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* は約 $1/3$ の検体から分離されたと報告している。私たちの成績は Killian ら¹⁰⁾の成績とはほぼ一致し, 唾液または歯垢に認められる菌種, あるいは両者に認められる菌種と様でないことが明らかになった。Sims¹⁾, Killian¹⁰⁾ ら, そして私たちは *H. influenzae* が歯垢からは分離されず, 唾液中に低率に分離される点で一致したが, 佐々木¹¹⁾らは3名の歯周病患者の歯周嚢と4名の健康者の歯肉溝から採取した検体のすべてから *H. influenzae* を分離したと報告しており, 部位の違いなどが細菌の定着, 生息に影響し, 菌種の特異的分布をきたしていると考えられる。また歯垢中に多くみられる *H. aphrophilus* や *H. paraphrophilus* 中には液体培地で顆粒状に発育し, 壁付着性を示すという報告¹⁰⁾があるが, 私たちも *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* の中に同じような発育を示すものを観察した。このことは *Streptococcus mutans* がその固着性によって歯垢形成に関与しているように *Haemophilus* 属菌も歯垢形成に関与し, 歯垢中に多く生存する一因となるのかどうか興味のあるところである。薬剤感受性についてみるとペニシリン系6剤のうち1940年代に発売された PCG, ABPC, SBPC にくらべ, 1980年代に入って発売された PIPC, APPC, MZPC の方が優れた抗菌力を示したが, この成績は Golberg¹²⁾, 松本¹³⁾, 小酒井¹⁴⁾が報告している成績と一致する。

最近 *H. influenzae* の ABPC 耐性菌出現

が問題になり、欧米のみならず我が国でもその報告がなされている¹⁵⁾¹⁶⁾。私たちも *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus* で PCG, ABPC, SBPC, CXM, CZX, CMX, CMZ, CEX, CCL に高度耐性を示す成績を得た。この中でペニシリン系薬剤に高度耐性を示した7株に β -lactamase 産生を確認し、 β -lactamase による耐性と考えられる結果を得た。またセフェム系薬剤 CEX, CCL に低感受性を示した株の β -lactamase 産生性を検討したが陰性であった。これらの菌株の中には β -lactamase 耐性の薬剤である CXM, CZX, CMX, CMZ に高度耐性を示すものも認められたが、これは β -lactamase 以外の機構による耐性と考えられる。

結 論

健康な成人38名の唾液と歯垢から *Haemophilus* 属菌の分離を試みた。その菌量はそれぞれ平均 6.6×10^6 /ml, 6.0×10^5 /g であった。また

分離した316株の *Haemophilus* 属菌を、生化学的性状により分類したところ、*H. influenzae* は11株 (3.5%) で biotype 別にみると I 型4株, II 型2株, III 型1株, IV 型3株, V 型1株で VI 型は分離されなかった。*H. parainfluenzae* は229株 (72.4%) で biotype 別では I 型173株 (75.5%), II 型18株 (7.9%), III 型38株 (16.6%) が分離された。一方 *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. parahaemolyticus* もそれぞれ5株 (1.6%), 64株 (20.3%), 7株 (2.2%) 分離された。また分離株101株についてペニシリン系薬剤6剤, セフェム系薬剤8剤, アミノグリコシド系薬剤2剤, マクロライド系薬剤1剤, テトラサイクリン系薬剤2剤と Chloramphenicol の計20剤に対する MIC を測定した。ペニシリン系薬剤 PCG, ABPC, SBPC とセフェム系薬剤 CXM, CZX, CMX, CMZ, CEX, CCL に MIC $\geq 100 \mu$ /ml の高度耐性を示す株があり、ペニシリン系薬剤の高度耐性株7株に β -lactamase 産生が認められた。

Abstract : For the purpose of clarifying their ecology, Haemophili which inhabit the upper respiratory tracts, were isolated from saliva and dental plaque of 38 healthy human adults. The isolates were then classified by biochemical properties, and were also tested for their sensitivity to antibiotics.

The average counts of *Haemophilus* in the saliva and that in dental plaque were 6.6×10^6 /ml and 6.0×10^5 /g, respectively.

Three hundred sixteen isolates were analyzed by biochemical properties. Eleven were identified as *H. influenzae* which were found only in saliva and then belonged to biotypes I ~ V, but not to VI. Two hundred twenty-nine isolates were identified as *H. parainfluenzae*. Of those biotype I and III were found in both saliva and dental plaque, but biotype II was found only in saliva. Sixty four *H. paraphrophilus* were isolated from both saliva and dental plaque. Five isolates *H. aphrophilus* were found only in dental plaque, and 7 *H. parahaemolyticus* only in saliva.

One hundred one strains comprising *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* and *H. parahaemolyticus* were tested for using different 20 antibiotics. Among 6 penicillins, PCG showed weak antibacterial activity, however PIPC, APPC, MZPC exerted very strong antibacterial activity. Among 8 cepharosporins CZX exhibited strong antibacterial activity and its peak minimum inhibitory concentration (MIC) was 0.5μ g/ml.

Some isolates showed high resistance to PCG, ABPC, SBPC, CXM, CZX, CEX or CCL (their MIC being $\geq 100 \mu$ g/ml), The penicillin-resistance strains produced β -lactamase.

文 献

- 1) Sims, W. : Oral Haemophili. J. Med. Microbiol. 3 : 615-625, 1970.
- 2) Witorsch, P. and Goden, P. : *Haemophilus*

aphrophilus endocarditis. Ann. Intern. Med. 60 : 957-961, 1964.

- 3) Sims, W. : Lack of association between Haemophili and human periodontal disease. Archs. oral. biol. 17 : 1029-1039, 1972.

- 4) Sims, W. : The clinical bacteriology of purulent oral infections. Br. J. Oral Surg. 12 : 1-12, 1974.
- 5) Killian, M. : A taxonomic study of genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J. Gen. Microbiol. 93 : 9-62, 1976.
- 6) Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.K. Jr. and Truant, J. P. : Manual of clinical microbiology, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 330-336, 1980.
- 7) Killian, M. and Frederiksen, W. : *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*. Academic Press Inc. London, Ltd., 281-290, 1980.
- 8) Kovacs, N. : Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178 : 703, 1956.
- 9) 五島瑳智子, 徐慶一郎, 河喜多竜祥, 小酒井望, 三橋進, 西野武志, 大沢伸考, 田波洋 : 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について, Chemotherapy, 29 : 76-79, 1981.
- 10) Killian, M. and Schoiott, C. R. : Haemophili and related bacteria in the human oral cavity. Archs oral Biol. 20 : 791-796, 1975.
- 11) Sasaki, N., Yanagi, K., and Takazoe, I. : Haemophili in the human gingival crevice. Bull. Tokyo dent. Coll. 19 : 191-195, 1978.
- 12) Golberg, R. and John, A. : The taxonomy and anti-microbial susceptibility of *Haemophilus* species in clinical specimens. Am. J. Clin. Pathol. 70 : 899-904, 1974.
- 13) 松本慶三, 渡辺貴和雄, 宇塚良夫, 鈴木寛, 野口行雄, 永武毅 : インフルエンザ菌の抗生物質感受性(PC耐性菌の出現)と血清型別および保存法と輸送, Chemotherapy, 26 : 167-174, 1978.
- 14) 小酒井望, 岡田淳, 小栗豊子 : 各種病原菌の抗菌薬感受性の現状と将来, 日本臨床, 39 : 121-134, 1981.
- 15) 西岡きよ, 荒井澄夫, 本田一陽, 会田博, 滝島任 : 呼吸器感染症患者より分離された β -lactamase 産生 *Haemophilus influenzae*. 医学のあゆみ, 106 : 199-201, 1978.
- 16) 黒崎知道, 中村明, 上原すず子, 寺島周, 沖本由理, 菅谷直子 : Chloramphenicol 耐性および Ampicillin, Chloramphenicol 両剤耐性インフルエンザ菌, 感染症誌, 56 : 286-292, 1982.