

口腔からの *Abiotrophia* の分離と抗菌薬感受性

田近 志保子

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：1996年10月18日)

(受理：1996年11月29日)

Abstract : The isolation medium for *Abiotrophia*, the isolation ratio of *Abiotrophia* from saliva and dental plaque of healthy adults, production of dextran and protease, and antimicrobial susceptibility of *Abiotrophia* were studied. The most appropriate medium for isolation of *Abiotrophia* was a double-layer agar plate made with a base layer of Columbia agar and a top layer of Columbia agar containing heat-killed *Micrococcus luteus* to reach the optical density of 2.0 units, pyridoxal and cysteine. Samples were taken from 93 healthy young human. Out of these human subjects, 72 strains of *Abiotrophia* (77.4 %) were isolated from saliva and dental plaque each. No isolation was observed in three human subjects. This suggests that *Abiotrophia* consists of normal flora in oral cavity. When 423 isolated *Abiotrophia* strains were identified, 192 of the 212 strains from saliva were *A. adiacens* (90.6 %), and 20 (9.4 %) were *A. defectiva*. Of the 211 strains from dental plaque, 180 were *A. adiacens* (85.3 %) and 31 (14.7 %) were *A. defectiva*. All of the strains produced dextran, and 28.7 % of *A. adiacens* and 66.7 % of *A. defectiva* produced protease. By the examination of the antimicrobial susceptibilities of 22 agents of the 92 strains of *Abiotrophia*, both *A. adiacens* and *A. defectiva* were high susceptible to antimicrobial agents tested : benzylpenicillin, ampicillin, amoxicillin, aspoxicillin, cephalixin, cefazolin, cefotaxime, ceftiofime, flomoxef, erythromycin, leucomycin and clindamycin. To imipenem/cilastatin, streptomycin, gentamicin, lincomycin and vancomycin, *A. adiacens* were lower than *A. defectiva*. Minimum bactericidal concentration/minimum inhibitory concentration ratio ≥ 2 occurred in benzylpenicillin. This indicates no penicillin tolerant strains were found.

Key words : *Abiotrophia adiacens*, *A. defectiva*, oral cavity, distribution, antimicrobial susceptibility

結 言

Abiotrophia はこれまで口腔レンサ球菌の菌種として *Streptococcus adjacens* と *S. defectivus* の 2 菌種^{1,2)} に分類されていた。1995年 Kawamuraら³⁾ により *S. adjacens* と *S. defectivus* の 16 S リボゾーム RNA の塩基配

列の検討から、これら 2 菌種を新たに *Abiotrophia* 属に分類することが提唱され、*A. adiacens* と *A. defectiva* の 2 菌種に分類された。*Abiotrophia* 属はヒトの口腔内に常在^{4,5)} し、臨床的には細菌性心内膜炎、敗血症、結膜炎、中耳炎、腭膿瘍、創傷感染などの感染症から分離されるが、とくに細菌性心内膜炎の起炎

The isolation and the antimicrobial susceptibility of *Abiotrophia* from oral cavity.

Shihoko TAJIKA

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

菌^{2, 6~8)}としてあげられ話題になっている。

細菌学的に *Abiotrophia* は通性嫌気性菌で発育に pyridoxal や L-cysteine を要求する特異な栄養要求性を有し、培養が困難であるところから通称 nutritionally variant streptococci (NVS) ともいわれた。また、*Abiotrophia* は他の口腔レンサ球菌と比較して培地上でのコロニーが微小でわかりにくく、分離が困難であった。そのため細菌性心内膜炎患者からの血液培養にさいし、増菌用のチオグリコレート培地には増殖するが、血液寒天培地には発育しない。したがって、細菌性心内膜炎が疑われながらも起炎菌の同定ができず、いわゆる培養陰性の心内膜炎としてあつかわれ、起炎菌不明のまま *Abiotrophia* を見逃していたケースもあったと考えられる。こうした現況より、検査室で誰にでも容易に *Abiotrophia* を分離できる培地の開発が望まれている。

本研究においては、Pompei ら⁹⁾の溶菌活性を指標にした *Abiotrophia* の分離培地について基礎的検討を行い、*Abiotrophia* 分離のために最も適した培地の条件を見だし、健康成人の唾液と歯垢から *Abiotrophia* の分離を試みた。菌種の同定は生化学的性状検査に加え、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の同定も行った。また、*Abiotrophia* の病原因子と考えられているデキストラン産生とプロテアーゼ産生¹⁰⁾を分離菌について検討した。近年ペニシリン耐性の *Abiotrophia* やペニシリントランスな *Abiotrophia* が臨床問題となっている^{11~14)}ところから *Abiotrophia* 分離株についてペニシリン系をはじめセフェム系、カルバペネム系、アミノグリコシド系、マクロライド系など各種抗菌薬感受性試験も行ったので報告する。

材料と方法

1. 材料

健康成人 93 名 (20 歳から 27 歳の男子 81 名と 20 歳から 25 歳の女子 22 名) の唾液と歯垢 (大白歯歯頸部から滅菌つま楊枝を用いて採取)

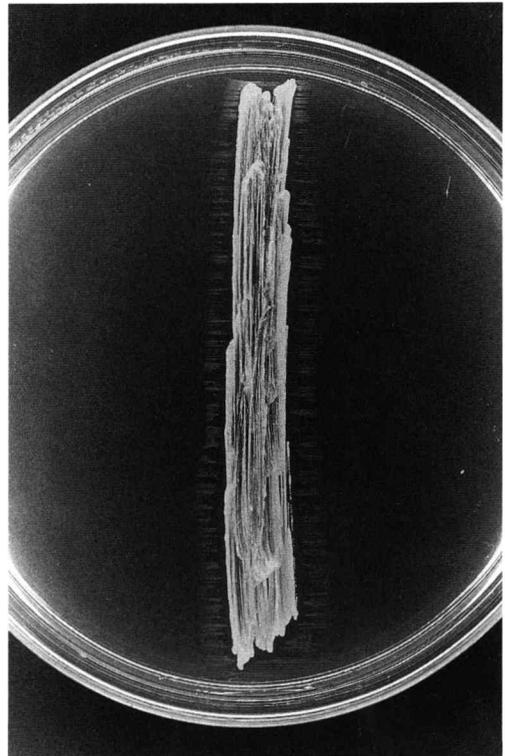


Fig. 1. Satellitism of *Abiotrophia*, around a helper culture of *Staphylococcus aureus* on a trypticase soy agar plate.

を材料とした。

2. 使用菌株

Abiotrophia の分離と菌種の同定に *Abiotrophia adiacens* (ATCC 49175^T), *A. defectiva* (ATCC 49176^T), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) を用いた。

3. *Abiotrophia* 分離培地の検討

基礎培地としてコロンビア寒天培地 (BBL), ブルセラ HK 寒天培地 (極東), Todd Hewitt broth (Difco) に寒天を加えた Todd Hewitt 寒天培地を用い, pyridoxal hydrochloride (和光純薬) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と L-cysteine hydrochloride (関東化学) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をそれぞれの培地に添加した。また、*Abiotrophia* の溶菌活性の指標として *M. luteus* の加熱死菌を 600 nm の OD 値が 1.0, 2.0, 4.0 となるように調整し、それぞれ

Table 1. Characterization of *Abiotrophia adiacens* and *A. defectiva* by biochemical tests.

Test	<i>A. adiacens</i>	<i>A. defectiva</i>
Fermentation of		
Trehalose	—	+
Inulin	±	—
Lactose	—	±
Raffinose	—	±
Hydrolysis of		
Starch	—	+
Enzyme production of		
α -Galactosidase	—	+
β -Galactosidase	—	+
β -Glucuronidase	±	—
β -Glucosidase	±	—
Pyrrolidonyl arylamidase	+	+
Leucine aminopeptidase	+	+
Presence of		
Chromophore	+	+

の培地に加え検討した。

すなわち *M.luteus* 加熱死菌を加えた培地を直接シャーレ (直径 90 mm) に流した単層平板培地と、はじめに基礎培地を流し固めた上に *M.luteus* 加熱死菌を含む同じ培地を 5 ml 重層した重層平板培地を作製した。

4. 培養条件

好気培養、ろうそく培養、嫌気培養 (ガスバック, BBL) の各培養方法で 37°C, 48 時間培養した。

5. *Abiotrophia* の確認と菌種の同定

(1) *Abiotrophia* の確認

Abiotrophia はグラム陽性球菌で, pyridoxal hydrochloride (10 μ g/ml) と L-cysteine hydrochloride (200 μ g/ml) を加えた羊血液寒天培地上で発育し, コロニーは小さく α 溶血を示す。また, *M.luteus* に対して溶菌活性を示し, さらに衛星現象 [*Abiotrophia* を trypticase soy 寒

天培地 (TSA, BBL) に塗布した後, *S. aureus* を直線状に塗布し培養すると *S. aureus* のコロニー周囲に *Abiotrophia* が発育する現象] (Fig.1) がみられる。カタラーゼ陰性, バンコマイシン (30 μ g/ml) 感受性などの諸性状を確認した。

(2) 生化学的性状検査による菌種の同定

Table 1 に示した生化学的性状について^{15,16)} ミニテックディスク (BBL) を用い, トレハロース, イヌリン, ラクトース, ラフィノースの発酵, デンプンの加水分解, β -ガラクトシダーゼ, ピロリドニールアリアルアミダーゼ, ロイシンアミノペプチダーゼの産生について検討した。

また, α -ガラクトシダーゼ, β -グルクロニダーゼ, β -グルコシダーゼ産生は Whiley ら¹⁷⁾ の蛍光基質を用いた蛍光発色法により検討した。

Table 2. Bacteriolytic activities and optical density of *Micrococcus luteus* used in isolation of *Abiotrophia*.

Medium	Mono or double-layer	Optical density (600 nm)		
		1.0	2.0	4.0
Columbia agar	Mono-layer	×	○	×
	Double-layer	○	◎	△
Brucella HK agar	Mono-layer	×	△	×
	Double-layer	×	○	×
Todd Hewitt agar	Mono-layer	×	△	×
	Double-layer	×	△	×

Bacteriolytic activities : ◎ clearly positive ; ○ certainly positive ; △ weakly positive ;
× not observed

(3)クロモフォア産生

Steinらの方法¹⁸⁾に従い、*Abiotrophia* を pyridoxal hydrochloride (10 µg/ml), L-cysteine hydrochloride (200 µg/ml) を含む 5 ml の Todd Hewitt broth で 37°C, 24 時間、嫌気培養して遠心分離した菌体に 2 N HCl 100 µl を加え、100°C, 5 分間加熱して菌液がピンクに発色したものをクロモフォア産生とした。

(4)DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の同定

Ezakiらの方法¹⁹⁾に従いDNAを抽出し、McInnesらの方法²⁰⁾でフォトビオチンを標識した基準株DNAを用いて、DNA-DNA ハイブリダイゼーション^{21, 22)}を行い、基準株DNAとの相同性が70%以上を示した分離株を同一菌種²³⁾とした。

6. デキストランおよびプロテアーゼの産生

(1) デキストラン産生

Abiotrophia を 5% sucrose と pyridoxal hydrochloride (10 µg/ml), L-cysteine hydrochloride (200 µg/ml) を含む 5 ml の Todd Hewitt broth で 37°C, 48 時間、嫌気培養し、培養液に3倍量のエタノールを加えて沈殿がで

きたものをデキストラン産生とした²⁴⁾。

(2) プロテアーゼ産生

Kregerらの方法²⁵⁾に従い *Abiotrophia* の培養上清 47.5 µl にアゾカゼイン (10 mg/ml, シグマ) を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 27.5 µl を加えて 37°C, 12 時間インキュベートした。そして反応した液に 15% トリクロル酢酸 25 µl を加え、遠心分離後、上清 50 µl を試験管にとり、0.5 N NaOH 50 µl を加えて 440 nm の吸光度を分光光度計 (DU-65, ベックマン) で測定した。対照として *Abiotrophia* 培養上清にかえて Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加えて測定した吸光度を 0 とし、対照に比して、高値を示したものをプロテアーゼ産生とした。

7. 抗菌薬感受性試験

Minimum inhibitory concentration (MIC) の測定は唾液、歯垢より分離した *A. adiacens* 81 株、*A. defectiva* 11 株の合計 92 株について日本化学療法学会標準法に基づく微量液体希釈法により測定した²⁶⁾。培地は NCCLS²⁷⁾ に従い Todd Hewitt broth に pyridoxal hydrochloride (10 µg/ml) と L-cysteine hydrochloride (200 µg/ml) を添加したものをを用いた。

Minimum bactericidal concentration (MBC) の測定^{28, 29)}は MIC 測定後、発育の見られなかったマイクロプレートの well から 10 μ l ずつとり滅菌生理食塩水で 100 倍に希釈して、pyridoxal hydrochloride (10 μ g/ml) を添加したチョコレート寒天培地に接種し、37°C、24 時間、嫌気培養後のコロニーを数えて、接種菌量の 99.9% 以上を殺菌した最小濃度を MBC とした。

使用抗菌薬：ペニシリン系はベンジルペニシリン (PCG, 万有), クロキサシリン (MCIPC, 明治), アンピシリン (ABPC, 武田), アモキシシリン (AMPC, 藤沢), アスポキシシリン (ASPC, 田辺), セフェム系はセファレキシン (CEX, シオノギ), セファゾリン (CEZ, 藤沢), セフォタキシム (CTX, ヘキスト), セフチゾキシム (CZX, 藤沢), セフトジウム (CAZ, 日本グラクソ), セフピロム (CPR, 日本ヘキスト・マリオン・ルセル), フロモキセフ (FMOX, シオノギ) を用いた。また、カルバペネム系はイミペネム/シラスタチン (IPM/CS, 万有), パニペネム/ベタミピロン (PAPM/BP, 三共), メロペネム (MEPM, 住友), アミノグリコシド系はストレプトマイシン (SM, 明治), ゲンタマイシン (GM, シェーリング・ブラウ), マクロライド系はエリスロマイシン (EM, 大日本製薬), ロイコマイシン (LM, 旭化成), リンコマイシン系はリンコマイシン (LCM, ファルマシア・アップジョン), クリンダマイシン (CLDM, ファルマシア・アップジョン), ポリペプチド系はバンコマイシン (VCM, シグマ) の合計 22 抗菌薬を用いた。

結 果

1. *Abiotrophia* 分離培地の検討

Table 2 に示すように *Abiotrophia* の溶菌活性を明瞭に観察できたのは、pyridoxal hydrochloride (10 μ g/ml) と L-cysteine hydrochloride (200 μ g/ml) を添加したコロンビア寒天培地に *M. luteus* 加熱死菌を OD 値が 2.0 となるように加え、重層した培地 (MLC 寒天培地) で

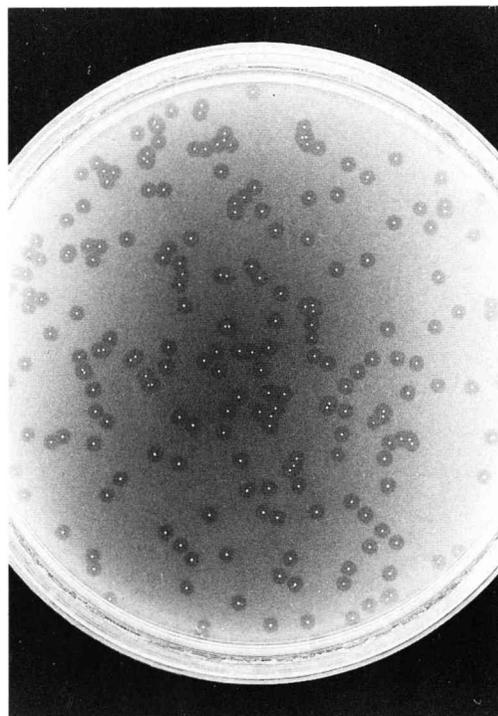


Fig. 2. Bacteriolytic activity of *Abiotrophia* on a *Micrococcus luteus* double layer Columbia agar plate, containing optical density of 2.0 units of heat-killed *M. luteus*.

あった。

コロンビア寒天培地を用いた単層培地、ブルセラ HK 培地や Todd Hewitt 寒天培地では *Abiotrophia* の溶菌活性が不明瞭あるいは観察できなかった。

Fig. 2 に *Abiotrophia* の溶菌活性を示した。コロニーの周囲が溶菌し透明帯が観察された。Fig. 3 は分離培地に材料を塗抹して培養したものを示した。矢印で示したコロニーが *Abiotrophia* で、他の菌に比べ小さいがコロニーの周囲に透明帯が観察でき溶菌活性を認めた。

2. 培養条件

Abiotrophia は好気培養、ろうそく培養、嫌気培養のいずれの培養方法でも発育が認められ通性嫌気性菌であることが確認できた。しかし、好気培養とろうそく培養では発育が悪く、

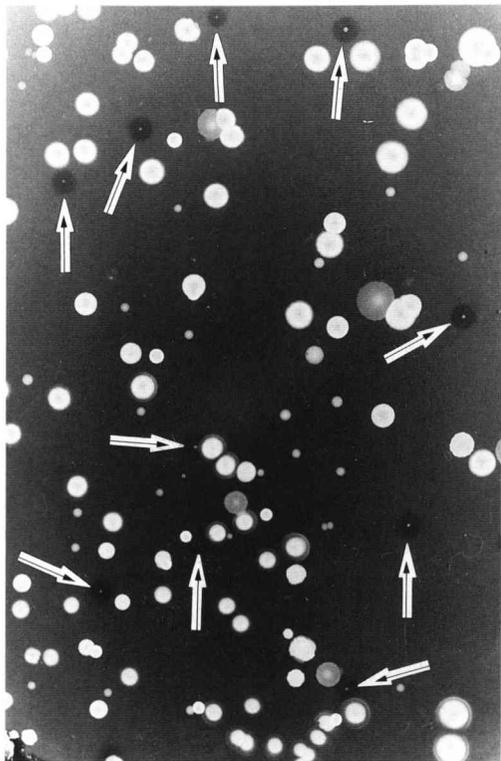


Fig. 3. Culture of a sample on a *Micrococcus luteus* double-layer agar plate. Pinpoint colonies surrounded by a halo are strains of *Abiotrophia* that produce bacteriolytic activity on *M. luteus*.

コロニーを観察することが困難であった。一方、ガスバックによる嫌気培養では発育が良好で、コロニーや溶菌活性を明確に観察することができた。

3. 唾液、歯垢中の *Abiotrophia* の定量

MLC 寒天培地を用いた嫌気培養で健康成人 93 名のうち、17 名について唾液、歯垢中の総菌数と *Abiotrophia* の菌数定量の結果を Table 3 に示した。唾液では総菌数が 7.0×10^7 CFU/ml から 2.2×10^9 CFU/ml で、平均 4.9×10^8 CFU/ml であり、*Abiotrophia* は 3.0×10^5 CFU/ml から 1.5×10^7 CFU/ml で、平均 4.4×10^6 CFU/ml であった。歯垢では総菌数が 1.2×10^6 CFU/mg から 2.0×10^8 CFU/mg で、平均 3.1×10^7 CFU/mg であり、*Abiotrophia* が 6.3

$\times 10^3$ CFU/mg から 1.2×10^6 CFU/mg で、平均 2.1×10^5 CFU/mg であった。総菌数のうち *Abiotrophia* の占める比率は唾液では 0.9%、歯垢では 0.7% であった。

また、*Abiotrophia* 以外の細菌種は口腔レンサ球菌属の *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius* やブドウ球菌属の *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri* そして嫌気性菌の *Bacteroides* spp., *Veillonella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Peptococcus niger* などであった。

4. 溶菌活性を示す細菌の分離と同定

Table 4 のように健康成人 93 名の唾液 93 検体のうち 72 検体から、歯垢は 93 検体のうち 72 検体から *Abiotrophia* を分離でき、いずれの材料からも 77.4% の分離率であった。また、Table 5 に唾液と歯垢各 72 検体から 1 検体あたり 5 コロニー釣菌し、*Abiotrophia* と確認できた 423 株の同定結果を示した。唾液由来の 212 株は *A. adiacens* が 192 株 (90.6%)、*A. defectiva* が 20 株 (9.4%) であった。歯垢由来の 211 株では *A. adiacens* が 180 株 (85.3%)、*A. defectiva* が 31 株 (14.7%) であった。*Abiotrophia* 分離株 (423 株) の 87.9% が *A. adiacens* で、12.1% が *A. defectiva* であり、口腔内から *A. adiacens* が高率に分離できた。また、健康成人 93 名の唾液と歯垢中の *Abiotrophia* の菌種別分布をみると、唾液から *A. adiacens* が分離できたのは 66 名、歯垢からは 63 名であった。また、*A. defectiva* が唾液から分離できたのは 6 名、歯垢から分離できたのは 9 名であった。いずれの菌種も唾液と歯垢中にはほぼ同程度に分布していた。また、同一人から *A. adiacens* と *A. defectiva* の両菌種を分離できたのは 3 名であった。

5. 生化学的性状検査で同定した *Abiotrophia* 分離株の DNA-DNA 相同性

基準株 *A. adiacens* (ATCC 49175^T) および *A. defectiva* (ATCC 49176^T) の DNA と *A. adiacens*, *A. defectiva* の分離株、各 5 株ずつの DNA 相同性を Table 6 に示した。*Abiotrophia* の基準株との相同性をそれぞれ

Table 3. *Abiotrophia* and total bacterial number in saliva and dental plaque of 93 healthy young human subjects.

Number of human subjects	Bacterial number of saliva (CFU/ml)		Bacterial number of dental plaque (CFU/mg)	
	<i>Abiotrophia</i>	Total	<i>Abiotrophia</i>	Total
1	3.0×10^5	7.0×10^7	1.1×10^5	6.8×10^6
2	2.8×10^6	1.3×10^8	2.8×10^5	3.2×10^7
3	4.0×10^6	3.2×10^8	1.6×10^5	8.4×10^6
4	1.9×10^6	1.2×10^8	6.3×10^4	1.6×10^7
5	2.5×10^6	3.8×10^8	2.5×10^4	8.8×10^6
6	1.5×10^7	8.0×10^8	5.5×10^4	2.4×10^6
7	7.5×10^5	1.6×10^8	8.3×10^3	3.6×10^6
8	6.8×10^6	6.6×10^8	8.3×10^4	3.2×10^7
9	3.8×10^5	1.1×10^8	8.3×10^4	1.3×10^7
10	1.0×10^7	2.2×10^9	5.2×10^4	1.1×10^7
11	1.1×10^6	1.1×10^8	9.0×10^4	1.4×10^7
12	1.1×10^7	1.3×10^9	5.0×10^5	7.6×10^7
13	4.0×10^6	2.6×10^8	6.3×10^3	1.2×10^6
14	4.5×10^5	8.6×10^8	3.5×10^4	5.8×10^6
15	6.0×10^5	1.3×10^8	8.0×10^5	7.4×10^7
16	1.2×10^7	4.8×10^8	6.5×10^4	7.6×10^6
17	1.4×10^6	2.6×10^8	1.2×10^6	2.0×10^8
Mean	4.4×10^6	4.9×10^8	2.1×10^5	3.1×10^7
+ S. D.	$+4.7 \times 10^6$	$+5.6 \times 10^8$	$+3.3 \times 10^6$	$+4.9 \times 10^6$

Each sample was inoculated on *M. luteus* double layer agar plates, and cultured 37°C for 48h.

S. D. : Standard deviation

Table 4. Isolation number and rate of *Abiotrophia* (*A. adiacens* and *A. defectiva*) from saliva and dental plaque of 93 healthy young human subjects.

Samples (number)	<i>Abiotrophia</i> (%)	<i>A. adiacens</i> (%)	<i>A. defectiva</i> (%)
Saliva (93)	72 (77.4)	66 (71.0)	6 (6.5)
Dental plaque (93)	72 (77.4)	63 (67.7)	9 (9.7)

100% とすると, *A. adiacens* 分離株の 2 から 6 は *A. adiacens* 基準株と 77% から 94% の相同性を示し, *A. adiacens* と同定できた。一方, *A. defectiva* 基準株とは 6% から 7% で *A.*

defectiva とは異種であることが確認できた。

また, *A. defectiva* 分離株の 8 から 12 は *A. defectiva* 基準株と 76% から 91% の相同性を示し *A. defectiva* と同定できた。一方, *A.*

Table 5. Isolation number and rate of *Abiotrophia adiacens* and *A. defectiva* from saliva and dental plaque.

Sample (number of strains)	<i>A. adiacens</i> (%)	<i>A. defectiva</i> (%)
Saliva (212 strains)	192 (90.6)	20 (9.4)
Dental plaque (211 strains)	180 (85.3)	31 (14.7)
Total (423 strains)	372 (87.9)	51 (12.1)

Table 6. Percentage of DNA-DNA homology between *Abiotrophia* strains.

Biotin labeled DNA	Percentage of hybridization to plate-bound DNA											
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>A. adiacens</i> (ATCC 49175 ^T)	100	77	94	90	83	78	7	6	6	7	6	7
<i>A. defectiva</i> (ATCC 49176 ^T)	6	7	6	7	7	6	100	91	85	76	93	84

*1 : DNA of *A. adiacens* (ATCC 49175^T), 2~6 : DNA of isolated *A. adiacens* strains.,
7 : DNA of *A. defectiva* (ATCC 49176^T), 8~12 : DNA of isolated *A. defectiva* strains.

Table 7. Percentage of *Abiotrophia adiacens* and *A. defectiva* strains with positive reactions for production of dextran and protease.

Test	Percentage of positive strains	
	<i>A. adiacens</i> (n=129)	<i>A. defectiva</i> (n=15)
Production of		
Dextran	100.0	100.0
Protease	28.7	66.7

adiacens の基準株とは6%から7%の相同性を示し異種であることが確認できた。

6. デキストランおよびプロテアーゼ産生

Table 7に *Abiotrophia* を分離できた唾液、

歯垢の各材料から1株ずつ選んだ144株 (*A. adiacens* 129株, *A. defectiva* 15株) のデキストランとプロテアーゼ産生の結果を示した。デキストランは *A. adiacens*, *A. defectiva* いずれ

Table 8. Susceptibilities of isolates *Abiotrophia adiacens* (81 strains) to antimicrobial agents.

Anti-microbial agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)												MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64			
PCG	13	39	29											0.06	0.125
MCIPC						7	59	15						2	4
ABPC		63	8	10										0.06	0.25
AMPC		62	19											0.06	0.125
ASPC		6	37	37	1									0.125	0.25
CEX							1	28	52					8	8
CEZ				11	38	30	1	1						0.5	2
CTX					19	20	14	9	16	3				2	8
CZX											20	32	29	32	64
CAZ						13	2	30	7	29				4	16
CPR				24	21	15	12	7	2					0.5	4
FMOX		11	59	9	2									0.125	0.25
IPM/CS			2	28	33	16			2					0.5	1
PAPM/BP			3	7	18	7	28	18						2	4
MEPM			2	4	45	27	2	1						0.5	2
SM						7	47	16	11					2	8
GM						5	45	31						2	4
EM		78	3											0.06	0.06
LM			19	22	30	7	3							0.25	1
LCM			5	17	24	23	9	3						0.5	2
CLDM		8	10	30	32		1							0.25	0.5
VCM			2	5	40	34								0.05	1

Abbreviations : PCG, benzylpenicillin ; MCIPC, cloxacillin ; ABPC, ampicillin ; AMPC, amoxicillin ; ASPC, aspoxicillin ; CEX, cephalixin ; CEZ, cefazolin ; CTX, cefotaxime, CZX, ceftizoxime, CAZ, ceftazidime ; CPR, cefpirome ; FMOX, flomoxef ; IPM/CS, imipenem/cilastatin ; PAPM/BP, panipenem/betamipron ; MEPM, meropenem ; SM, streptomycin ; GM, gentamicin

の菌種も 100% 産生した。また、プロテアーゼは *A. adiacens* が 129 株のうち 37 株 (28.7%), *A. defectiva* は 15 株のうち 10 株 (66.7%) が

プロテアーゼ産生株であった。

7. 抗菌薬感受性試験

健康成人 93 名の歯垢と唾液から分離した

Table 9. Susceptibilities of isolates *Abiotrophia defectiva* (11 strains) to antimicrobial agents.

Anti-microbial agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)												MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64			
PCG		10	1											0.06	0.06
MCIPC					6	4	1							0.5	1
ABPC		11												0.06	0.06
AMPC		11												0.06	0.06
ASPC		1	1	6	3									0.25	0.5
CEX								11						4	4
CEZ								11						4	4
CTX							11							2	2
CZX											2	9		64	64
CAZ								6	5					4	8
CPR						10	1							1	1
FMOX			1	10										0.5	0.5
IPM/CS									6	5				8	16
PAPM/BP				6	5									0.5	1
MEPM						10	1							1	1
SM								3	2	3	3			16	32
GM										6	5			16	32
EM		11												0.06	0.06
LM						2	9							2	2
LCM							2	4						2	4
CLDM					10	1								0.5	0.5
VCM						5	6							2	2

Abbreviations : PCG, benzylpenicillin ; MCIPC, cloxacillin ; ABPC, ampicillin ; AMPC, amoxicillin ; ASPC, aspoxicillin ; CEX, cephalixin ; CEZ, cefazolin ; CTX, cefotaxime, CZX, ceftizoxime, CAZ, ceftazidime ; CPR, cefpirome ; FMOX, flomoxef ; IPM/CS, imipenem/cilastatin ; PAPM/BP, panipenem/betamipron ; MEPM, meropenem ; SM, streptomycin ; GM, gentamicin

Abiotrophia 92 株の *A. adiacens* 81 株と *A. defectiva* 11 株に対する抗菌薬の MIC の値を Table 8 と Table 9 に示した。ペニシリン系抗

菌薬のうち PCG, ABPC, AMPC, ASPC は *A. adiacens*, *A. defectiva* いずれの菌種に対しても MIC₉₀ が 0.06 $\mu\text{g/ml}$ から 0.5 $\mu\text{g/ml}$ で感受性で

Table 10. Minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations of benzylpenicillin of *Abiotrophia*.

Species of <i>Abiotrophia</i>	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MBC ($\mu\text{g/ml}$)
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
<i>A. adiacens</i> (81 strains)	0.03 ~ 0.125	0.06	0.125	0.06 ~ 0.25
<i>A. defectiva</i> (11 strains)	0.06 ~ 0.125	0.06	0.06	0.125 ~ 0.25

あった。一方、MCIPC は *A. adiacens* で MIC₉₀ は 4 $\mu\text{g/ml}$, *A. defectiva* では 1 $\mu\text{g/ml}$ で感受性は低かった。セフェム系抗菌薬は CEX, CEZ, CTX, CPR, FMOX がいずれの菌種にも感受性を示したが, CZX, CAZ の感受性は低かった。カルバペネム系抗菌薬では, *A. adiacens* の MIC₉₀ は 1 $\mu\text{g/ml}$ から 4 $\mu\text{g/ml}$ で感受性が低く, *A. defectiva* では IPM/CS の MIC₉₀ は 16 $\mu\text{g/ml}$ で感受性が低かった, しかし PAMP/BP, MEPM は 1 $\mu\text{g/ml}$ で, *A. adiacens* にくらべて感受性は高かった。アミノグリコシド系の SM と GM はいずれの菌種に対しても MIC₉₀ は 4 $\mu\text{g/ml}$ から 32 $\mu\text{g/ml}$ で感受性は低かった。マクロライド系抗菌薬の EM と LM はいずれの菌種に対しても高い感受性を示し, とくに EM の感受性は MIC₉₀ が 0.06 $\mu\text{g/ml}$ で高感受性であった。リンコマイシン, ポリペプチド系抗菌薬では *A. adiacens* に対して LCM, CLDM, VCM などいずれの抗菌薬も高い感受性を示した。一方, *A. defectiva* の MIC₉₀ は LCM で 4 $\mu\text{g/ml}$, VCM は 2 $\mu\text{g/ml}$ と *A. adiacens* にくらべ感受性が低かった。

Table 10 に *A. adiacens* (81株), *A. defectiva* (11株) の PCG に対する MIC と MBC を示した。*A. adiacens* の MIC は 0.03 $\mu\text{g/ml}$ から 0.125 $\mu\text{g/ml}$ で, MBC は 0.06 $\mu\text{g/ml}$ から 0.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。*A. defectiva* の MIC は 0.06 $\mu\text{g/ml}$ から 0.125 $\mu\text{g/ml}$ であったが, MBC は 0.125 $\mu\text{g/ml}$ から 0.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。また, MBC/MIC

をみると *A. adiacens*, *A. defectiva* はいずれも 2 以下の差であり, MBC/MIC が 32 以上を示すペニシリントレランス株は検出できなかった。

考 察

細菌性心内膜炎の原因菌としては viridans streptococci が最も多く, 中でも *Streptococcus sanguis* の分離頻度が高い。また, viridans streptococci による細菌性心内膜炎は, 抜歯や種々の歯科処置がその誘因となることも報告³⁰⁾されている。かつては nutritionally variant streptococci (NVS) といわれ口腔レンサ球菌に分類されていた *Abiotrophia* は, 近年細菌性心内膜炎の起炎菌として国内外で注目され, 諸外国においては細菌性心内膜炎の患者から分離した viridans streptococci のうち 5% から 10% が *Abiotrophia* であったと報告している³¹⁻³³⁾。わが国では現在まで *Abiotrophia* による細菌性心内膜炎は 8 例の報告^{13, 34-36)}があり, とくに最近, 報告例が増えて来ている。

臨床材料での分離が困難であるといわれた *Abiotrophia* の分離には, 著者の研究結果からコロンビア寒天重層平板培地に pyridoxal (10 $\mu\text{g/ml}$), L-cysteine (200 $\mu\text{g/ml}$) を添加し, *M. luteus* に対するの溶菌活性を指標にした培地を用い, 嫌気培養を行うことが最良の方法であると考えられる。この方法で *Abiotrophia* を分離し, 生化学的性状検査に加えて DNA-DNA ハイブ

リダイゼーションによる *Abiotrophia* 菌種の同定を行うことにより、細菌性心内膜炎における起炎菌の正確な同定も可能になると考える。

Abiotrophia は口腔レンサ球菌で口腔に常在していると言われているが、詳細に検討した報告はみられない。本研究においては *Abiotrophia* の口腔における常在性と *A. adiacens* と *A. defectiva* の分布を把握するため健康成人 93 名の唾液と歯垢から *Abiotrophia* の分離を試みた。その結果 93 名中 90 名 (96.8%) から *Abiotrophia* を分離でき、定量すると唾液では平均 4.4×10^6 CFU/ml、歯垢では平均 2.1×10^5 CFU/mg 保有していることがわかり、口腔における *Abiotrophia* の常在性を明らかにすることができた。また、健康成人 93 名から分離した *Abiotrophia* 菌種別の分離率は *A. adiacens* が 87.9%、*A. defectiva* が 12.1%、*A. adiacens* および *A. defectiva* の両菌種を分離できた人が 3.3% あった。わが国での *Abiotrophia* 菌種別の分離報告では細菌性心内膜炎患者から *A. adiacens* と *A. defectiva* は同程度分離されていることから、著者の研究では *A. defectiva* は口腔での保有率が *A. adiacens* にくらべかなり低い、細菌性心内膜炎の起炎菌として発症する可能性は高いことも考えられる。

口腔レンサ球菌の一菌種である *S. mutans* は菌体外にデキストランを産生し、歯面への付着や定着に重要な役割を担い、*S. mutans* の病原因子となっている³⁷⁾。*Abiotrophia* においても産生するデキストランが心内膜への付着、定着に関連した病原因子として考えられる。また、*in vivo* の実験においてデキストランが抗菌薬の効果を低下させることが示唆されている⁸⁾。これらの点から著者は *Abiotrophia* のデキストラン産生について調べたが *A. adiacens*、*A. defectiva* のいずれの菌種も 100% 産生することより、*Abiotrophia* の病原因子としての関連性が示唆された。また、*Abiotrophia* 分離株のプロテアーゼ産生は、*A. adiacens* で 129 株中 37 株 (28.7%)、*A. defectiva* では 15 株中 10 株 (66.7%) で *A. defectiva* が高かった。口腔レン

サ球菌の一菌種で *Abiotrophia* と同様に歯垢や唾液に多く分布している *S. sanguis* は、菌体外に IgA protease を産生³⁸⁾することが知られている。本研究における *Abiotrophia* の産生するプロテアーゼも種々の生体成分を基質として、血清や分泌物中の抗体を分解することによる感染防御能の抑制や組織破壊による炎症惹起の原因となることも考えられるが、現在のところ *Abiotrophia* の産生するプロテアーゼが感染に果たす役割については明らかではない。今後 *Abiotrophia* による感染症とくに細菌性心内膜炎とこれら病原因子、とくにデキストランの付着、定着因子あるいはプロテアーゼの起炎性因子との関連を検討していきたい。

次に健康成人から分離した *Abiotrophia* の抗菌薬感受性についてみると、ペニシリン系抗菌薬の PCG、ABPC、AMPC、ASPC は MIC₉₀ が 0.06 µg/ml から 0.5 µg/ml、VCM や EM では MIC₉₀ が 0.06 µg/ml から 2 µg/ml と高感受性であり、ほかにカルバペネム系、リンコマイシン系抗菌薬にも高感受性であった。しかし、健康成人由来の *Abiotrophia* 分離株でも必ずしもすべての抗菌薬に感受性があるとは限らなかった。とくにセフェム系の抗菌薬のうち CEX、CEZ、CTX、CPR、FMOX では高感受性であったが、CZX、CAZ では MIC₉₀ が 16 µg/ml から 64 µg/ml と低感受性で、Gephart ら⁶⁾のセフェム系抗菌薬の一部が *Abiotrophia* に低感受性であるという報告を支持する結果であった。また、*Abiotrophia* の臨床分離株でも SM や GM には感受性がある¹¹⁾といわれているが、著者が分離した *A. adiacens* の MIC は SM で 4 µg/ml 以下、GM では 8 µg/ml 以下の感受性であったが、*A. defectiva* は SM の MIC が 16 µg/ml をこえる株が 6 株、GM では 11 株すべて MIC が 16 µg/ml 以上であり、*A. defectiva* では SM に対する MIC が 0.13 µg/ml から 32 µg/ml という Gephart らの報告⁶⁾と一致した成績であった。以上 *Abiotrophia* はペニシリン系抗菌薬に対しては感受性があるが、一部のセフェム系抗菌薬には感受性がよくないことを明らかにできた。

近年、ペニシリン耐性あるいはペニシリントランス *Abiotrophia* の出現が臨床上問題となっている^{6,10,13,14}。著者が分離した *Abiotrophia* は PCG に対して MIC が 0.03 µg/ml から 0.125 µg/ml を示し、ペニシリン感受性であったが、4 µg/ml 以上の耐性菌はなかった。また、MBC/MIC の比が 2 以下であり、MBC/MIC の比が 32 以上を示すペニシリントランス株もなかった。これまで報告されているペニシリン耐性あるいはトランス株は臨床材料からの分離株であり、著者が分離した *Abiotrophia* は健康成人由来株であることがその一因と考えられる。

Abiotrophia による細菌性心内膜炎の治療には PCG と GM, SM などのアミノグリコシドとの併用療法³⁹⁾が行われている。しかし、その起炎菌がペニシリン耐性あるいはペニシリントランスであった場合、他のレンサ球菌による細菌性心内膜炎に比べ難治性であり、再発や死亡例も多く、合併症の頻度も高いといわれている¹⁰⁾。

したがって *Abiotrophia* による細菌性心内膜炎の診断および治療には、本研究において著者が使用したような *Abiotrophia* 分離培地を用い、起炎菌の分離と同定、さらに PCG, GM, SM などの抗菌薬感受性を測定することが重要であると考えられる。

結 語

1. 溶菌活性を指標にした *Abiotrophia* の分離培地は、*M. luteus* の加熱死菌を OD 値が 2.0 となるように加えたコロムビア寒天重層平板培地が最も適していた。また、*Abiotrophia* の培養方法は好気培養とろうそく培養にくらべ、嫌気培養では発育が良くコロニーを観察するには最適であった。
2. 健康成人 93 名からの *Abiotrophia* 分離は、唾液では 93 名中 72 名 (77.4%)、歯垢では 93 名中 72 名 (77.4%) から分離した。唾液、歯垢いずれの材料からも分離できたのは 54 名 (58.1%)、いずれの材料からも分離できな

かったのは 3 名 (3.2%) のみであった。

3. *Abiotrophia* 分離株 423 株を生化学性状検査によって菌種を同定すると、唾液由来の *Abiotrophia* 212 株中 *A. adiacens* は 192 株 (90.6%)、*A. defectiva* が 20 株 (9.4%) であった。また、唾液由来の *Abiotrophia* 211 株中 *A. adiacens* は 180 株 (85.3%)、*A. defectiva* が 31 株 (14.7%) であった。
4. 生化学的性状検査によって菌種の同定ができた分離株は、DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより基準株との相同性が 76% から 94% で生化学的性状検査による同定と一致した成績であった。
5. *Abiotrophia* 分離株のデキストラン産生は、*A. adiacens*, *A. defectiva* いずれの菌種も 100% であった。また、*Abiotrophia* のプロテアーゼ産生は *A. adiacens* で 28.7%、*A. defectiva* で 66.7% で *A. defectiva* が高かった。
6. *Abiotrophia* 分離株はペニシリン系 (PCG, ABPC, AMPC, ASPC)、セフェム系 (CEX, CEZ, CTX, CPR, FMOX)、マクロライド系抗菌薬 (EM, LM) とリンコマイシン系抗菌薬 (CLDM) に対しては高い感受性を示した。また、カルバペネム系 (IPM/CS)、アミノグリコシド系 (SM, GM)、リンコマイシン系抗菌薬 (LCM)、そしてポリペプチド系抗菌薬の (VCM) は *A. adiacens* に比べて *A. defectiva* の感受性が低かった。また、*Abiotrophia* 分離株の PCG の MBC/MIC 比は 2 以下であり、ペニシリントランス株は検出できなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導を賜りました岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座金子 克教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに、本研究を進めるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻頂きました口腔微生物学講座佐々木実助教授に心より感謝の意を表します。また、種々ご協力頂きました口腔微生物学講座の皆様にも深く感謝いたします。

本論文の要旨は、岩手医科大学歯学会第41回例会（平成8年2月24日）において発表した。

文 献

- 1) Frenkel, A., and Hirsch, W. : Spontaneous development of L forms of streptococci requiring secretion of other bacteria or sulphhydryl compounds of normal growth. *Nature* 191 : 728-730, 1961.
- 2) Bouvet, A., Grimont, F., and Grimont, P. A. D. : *Streptococcus defectivus* sp. nov. and *Streptococcus adjacens* sp. nov., nutritionally variant streptococci from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 : 290-294, 1989.
- 3) Kawamura, Y., Hou, X., Sultana, F., Liu, S., Yamamoto, H., and Ezaki, T. : Transfer of *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov., as *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 : 798-803, 1995.
- 4) George, R. H. : The isolation of symbiotic streptococci. *J. Med. Microbiol.* 7 : 77-83, 1974.
- 5) Ruoff, K. L. : Nutritionally variant streptococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 : 184-190, 1991.
- 6) Gephart, J. F., and Washington, J. A. II. : Antimicrobial susceptibilities of nutritionally variant streptococci. *J. Infect. Dis.* 146 : 536-539, 1982.
- 7) Roberts, R. B., Krieger, A. S., Schiller, N. L., and Gross, K. C. : Viridans streptococcal endocarditis ; role of various including pyridoxal-dependent streptococci. *Rev. Infect. Dis.* 1 : 955-965, 1985.
- 8) Bouvet, A. : Human endocarditis due to nutritionally variant streptococci : *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus*. *Eur. Heart J.* 16 (Suppl. B) : 24-27, 1995.
- 9) Pompei, R., Caredda, E., Piras, V., Serra, C., and Pintus, L. : Production of bacteriolytic activity in the oral cavity by nutritionally variant streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1623-1627, 1990.
- 10) 江成唯子 : Nutritionally variant streptococci と臨床検査, 日臨徴誌, 6 : 43-45, 1996.
- 11) Cooksey, R. C., and Swenson, J. M. : *In vitro* antimicrobial inhibition patterns of nutritionally variant streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16 : 514-518, 1979.
- 12) Holloway, Y., and Dankert, J. : Penicillin tolerance nutritionally variant streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22 : 1073-1075, 1982.
- 13) 菊池 賢, 戸塚恭一, 清水喜八郎, 江成唯子, 柴田雄介, 長谷川裕美 : Nutritionally variant streptococci による感染性心内膜炎の細菌学のおよび臨床的検討, 感染症誌, 68 : 830-836, 1994.
- 14) Douglas, C. P., Siarakas, S., and Gottlieb, T. : Evaluation of E test as rapid method for determining MICs for nutritionally variant streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 2318-2320, 1994.
- 15) Cooksey, R. C., Thompson, F. S., and Facklam, R. R. : Physiological characterization of nutritionally variant streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 10 : 326-339, 1979.
- 16) Bouvet, A., Villeroy, F., Cheng, F., Lamesch, C., Williamson, R., and Gutmann, L. : Characterization of nutritionally variant streptococci by biochemical tests and penicillin binding proteins. *J. Clin. Microbiol.* 22 : 1030-1034, 1985.
- 17) Whiley, R. A., Fraser, H., Hardie, J. M., and Beighton, D. : Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "*Streptococcus milleri*" group. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1497-1501, 1990.
- 18) Stein, D. S., and Libertin, C. R. : A double-blinded comparative evaluation of three media for chromophore testing with viridans and nutritionally variant (deficient) streptococci. *Am. J. Clin. Pathol.* 91 : 589-593, 1989.
- 19) Ezaki, T., Saidai, D. M., Hashimoto, Y., Yamamoto, H., and Yabuuchi, E. : Rapid procedure to determine the DNA base composition from small amount of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 67 : 127-130, 1990.
- 20) MacInnes, J. L., Vise, P. D., Habili, N., and Symons, R. H. : Chemical biotinylation of nucleic acid with photobiotin and their use as hybridization probes. *Focus* 9 : 1-4, 1987.
- 21) Ezaki, T., Hashimoto, Y., Takeuchi, N., Yamamoto, H., Liu, S., Miura, H., Matsui, K., and Yabuuchi, E. : Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.* 26 : 1708-1713, 1988.
- 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 : 851-855, 1990.
- 23) Ezaki, T., Takeuchi, N., Liu, S., Kai, A., Yamamoto, H., and Yabuuchi, E. : Small-scale DNA preparation for rapid genetic identification of *Campylobacter* species without radioisotope. *Microbiol. Immunol.* 32 : 141-150, 1988.
- 24) Pelletier, L. L. Jr., Coyle, M., and Petersdorf, R. : Dextran production as a possible virulence factor in streptococcal endocarditis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 158 : 415-420, 1979.
- 25) Kreger, A. S., and Gray, L. D. : Purification of *Pseudomonas aeruginosa* protease and microscopic characterization of pseudomonal protease-

- induced rabbit corneal damage. *Infect. Immun.* 19 : 630-648, 1978.
- 26) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告; 微量液体希釈法による MIC 測定法日本化学療法学会標準法, *Chemotherapy* 38 : 102-105, 1990.
- 27) National committee for clinical laboratory standards : Approved standard M7-A2, methods for dilution antimicrobial susceptibility tests that grow aerobically. 2nd ed. NCCLS, Villanova, pp.1-30, 1990.
- 28) Issenberg, H. D. : Tests to assess bactericidal activity. in ; Issenberg, H. D. (ed), *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 1-33, 1992.
- 29) National committee for clinical laboratory standards : Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. NCCLS Document M26-T. : 12 : 1-36, 1992.
- 30) 勝 正孝 : 感染性心内膜炎の現況, 日医師会誌, 84 : 869-886, 1980.
- 31) McCarthy L. R., and Bottone, E. J. : Bacteremia endocarditis caused by satelliting streptococci. *Am. J. Clin. Pathol.* 61 : 585-691, 1974.
- 32) Peterson, C. E., Cook, J. L., and Burke, J. P. : Media-dependent subculture of nutritionally variant streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 4 : 634-636, 1981.
- 33) Wilson, W. R., and Geraci, J. E. : Treatment of streptococcal infective endocarditis. *Am. J. Med.* 78 : 128-137, 1985.
- 34) 藤田昭一, 松原藤雄, 野田八嗣 : Nutritionally variant streptococci による感染性心内膜炎の 1 例, 感染症誌, 56 : 705-709, 1982.
- 35) 竹内弘明, 村上康弘, 中村正夫 : *Streptococcus adjacens* による感染性心内膜炎の 1 例, 日臨微誌, 6 : 46-50, 1996.
- 36) 佐藤智明, 藤田和美, 池田政勝, 森本浩司, 坂本春夫 : 血液培養から Nutritionally variant streptococci の分離経験, 日臨微誌, 5 : 51-55, 1996.
- 37) Mukasa, H., and Slade, H. D. : Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface. I. Role of insoluble dextran-levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. *Infect. Immun.* 8 : 555-562, 1973.
- 38) Kilian, M., and Holmgren, K. : Ecology and nature immunoglobulin A1 protease-producing streptococci in the human oral cavity and pharynx. *Infect. Immun.* 91 : 868-873, 1981.
- 39) Bino, A. L., Dismukes, A. L., Durack, D. T., Kaplau, E. L., Karchmer, A. W., Kaye, D., Rahimtoola, S. H., Sande, M. A., Sanford, J.P., Watanakunakorn, C., and Wilson, W. R. : Antimicrobial treatment of infective endocarditis due to viridans streptococci, enterococci, and staphylococci. *J. A. M. A.* 261 : 1471-1477, 1989.