原 著

β -Lactamase 阻害剤による歯性感染症由来
Prevotella intermedia β -lactamase 活性の阻害

真 下 尚 人 尾 上 孝 利

大阪歯科大学細菌学講座（主任：佐川寛典教授）

〔受付：平成8年1月9日，受理：平成8年4月8日〕

Effect of β -lactamase inhibitors on the β -lactamase activity of *Prevotella intermedia* from
odontogenic infections

Naoto Mashimo and Takatoshi Onoe

Department of Bacteriology, Osaka Dental University

(Chief : Prof. Hirotsuke Sagawa)

5-31 Otemae, 1-chome, Chuo-ku Osaka 540, Japan

[Received on January 9, 1996 ; Accepted on April 8, 1996]

Key words : β -lactam resistance/ β -lactamase/ β -lactamase inhibitor/*Prevotella intermedia*/synergistic effect

Abstract : β -Lactamase is closely related to the mechanism of β -lactam resistance in *Prevotella intermedia* from odontogenic infections. We studied the efficacy of β -lactamase inhibitors to design compounds of β -lactams and β -lactamase inhibitors with the most potent activity against β -lactamase producing clinical isolates of *Prevotella intermedia*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each β -lactamase inhibitor, clavulanic acid (CVA), sulbactam (SBT) and tazobactam (TAZ) was in the range 0.06~8.0 μ g/ml against fourteen β -lactamase producing clinical isolates of *Prevotella intermedia*. In penicillin G with 0.5~2.0 μ g/ml of β -lactamase inhibitors, the efficacy of inhibitors that caused a marked reduction in the growth of β -lactamase producing clinical isolates of *Prevotella intermedia* was 79~94% of the isolated strains for CVA, 73~100% for SBT, and 86~100% for TAZ. Hydrolyzed activity of β -lactamase for substrate cefazolin was lost after incubation of each β -lactamase inhibitor and crude β -lactamase which extracted from β -lactamase producing clinical isolates. Combinations of each inhibitor and ampicillin, piperacillin, cephalexin, cefaclor, cefazolin, cefoperazone, and ceftazidime were also found to have an inhibitory synergistic effect against clinical isolates.

We found the antibacterial efficacy of combinations of β -lactams and β -lactamase inhibitors was stronger than that of penicillins and cephalosporins themselves except for imipenem against odontogenic infections with β -lactamase producers of *Prevotella intermedia*.

抄録：歯性感染症由来 *Prevotella intermedia* (*P. i*) における β -lactam 薬耐性の主体は β -lactamase (β -lac) である。本研究では β -lac 産生性 (β -lac⁺) *P. i* に強い抗菌性を示す β -lactam 薬と β -lac 阻害剤 (阻害剤) との合剤を考案するための基礎的結果を得るために阻害剤の効果を検討した。14 株の β -lac⁺ *P. i* に対する clavulanic acid (CVA), sulbactam (SBT) および tazobactam (TAZ) の最小発育阻止濃度はいずれの薬剤も 0.06~8.0 μ g/ml の範囲であった。0.5~2.0 μ g/ml の阻害剤を penicillin G (PCG) に添加した場合の増殖阻止は CVA では 79~94%, SBT では 73~100%, TAZ では 86~100% の菌株で認められた。抽出した粗酵素と阻害剤を反応させると基質 cefazolin (CEZ) に対する酵素活性は阻止された。阻害剤との相乗効果は PCG, ampicillin, piperacillin, cephalexin, cefaclor, CEZ, cefoperazone および ceftazidime との合剤でみられた。

以上の事実は、 β -lac⁺ β -lactam 薬耐性株による歯性感染症の治療に阻害剤と β -lactam 薬の合剤が有効であることを示唆している。

緒 言

歯性感染症は内因感染症であり、その病巣から種々の口腔常在嫌気性菌が検出されることは周知の事実である¹⁻⁷⁾。嫌気性グラム陰性桿菌の中では *Prevotella*, *Bacteroides* および *Fusobacterium* が優位に分離される症例が報告されている^{1,4-6)}。

歯性感染症由来細菌の β -lactamase 活性をニトロセフィン法で調べると、*Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *P. melaninogenica*, *Bacteroides capillosus* (*B. capillosus*) などから β -lactamase 産生菌株が検出されている^{1,5,7-9)}。これらの菌株では、 β -lactamase 産生性と β -lactam 薬の最小発育阻止濃度 (MIC) の上昇が相関すると述べられている^{1,8-11)}。

β -Lactam 薬は、抗菌スペクトルが広く副作用が少ないため、種々の感染症の第一選択薬として投与されている。しかし、これら薬剤によって β -lactam 薬耐性株の選択と耐性化が引き起こされることも指摘されている^{12,13)}。事実、口腔常在菌の *P. intermedia* では、ampicillin (ABPC) 高度耐性株が容易に *in vitro* で得られている¹⁴⁾。感染病巣部における β -lactam 薬耐性の主体は、 β -lactamase と考えられているため、医科領域では種々の細菌の β -lactamase が研究されている¹⁵⁻¹⁹⁾。また、 β -lactamase 抵抗性 β -lactam 薬の使用だけでなく、 β -lactamase 阻害剤 (阻害剤) と β -lactam 薬との合剤も開発されている²⁰⁻³¹⁾。一方、歯性感染症は口腔常在嫌気性グラム陰性桿菌に起因する場合が多いことから¹⁻⁷⁾、これらの細菌に由来する β -lactamase に関する研究は緒についたばかりであり^{14,19,32)}、阻害剤に関する報告はほとんどみられない。

最近、木下³³⁾は、ceftazidime (CCL) を用いて唾液から分離した嫌気性グラム陰性桿菌の 98% が β -lactamase を産生すること、また、*P. intermedia* の耐性因子が *B. capillosus* に伝達されることを明らかにしている。さら

に、田中³⁴⁾は、*P. intermedia* の β -lactam 薬耐性の主体が不活化酵素の β -lactamase であることを阻害剤実験で明らかにするとともに、 β -lactamase を精製した。その結果、本菌の β -lactamase は *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) などのそれとは分子量や等電点が異なることを示唆している。

以上のように、口腔常在菌叢は β -lactam 薬耐性菌を含み、その分布と耐性値は投与された β -lactam 薬の影響を常に受けるため、 β -lactam 薬耐性菌は歯性感染症難治化の一因をなすと考えられている。

本研究では、 β -lactamase 産生菌に起因する歯性感染症の治療成績を高めるために、阻害剤に関する基礎的研究を行うことを目的としている。そこで、 β -lactamase 産生性 *P. intermedia* を用いて 3 種阻害剤の効果を細胞増殖系と酵素レベルで検討した。

材料と方法

1. 供試菌株

供試菌株は、1988 年以来閉鎖性膿瘍から分離後、*Prevotella*, *Porphyromonas* の標準菌株との DNA 相同性値³⁵⁾から同定した *P. intermedia* 14 株を用いた。これら菌株はニトロセフィン (Oxoid) 法で β -lactamase 産生性を有していた。菌株の保存は、dimethylsulfoxide 添加 Todd Hewitt broth (BBL) を用いて -80°C で行った。菌株は通法³⁶⁾により、CDC 処方嫌気性菌用血液寒天培地³⁷⁾で培養後、vitamin K₁ と hemin を添加した trypticase soy broth (VHTSB, BBL) で 24 時間嫌気培養して用いた。

2. 供試薬剤

阻害剤は clavulanic acid (CVA, スミスクラインビーチャム), sulbactam (SBT, ファイザー製薬) および tazobactam (TAZ, 大鵬薬品) を使用した。 β -lactam 薬は、penicillin G (PCG, 明治製薬), ABPC (明治製薬),

piperacillin (PIPC, 富山化学), cefazolin (CEZ, 藤沢薬品), cephalexin (CEX, 塩野義製薬), CCL (塩野義製薬), cefoperazone (CPZ, 富山化学), ceftam (CFTM, 富山化学), cefmetazole (CMZ, 三共), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), imipenem (IPM, 萬有製薬) および aztreonam (AZT, エーザイ) を用いた。これら β -lactam 薬のうち CPZ, CFTM, CMZ, LMOX, IPM および AZT は β -lactamase に抵抗性を示す³⁸⁾。

3. MIC 測定法

MIC は化学療法学会標準法の微量液体希釈法³⁹⁾で測定した。感受性測定培地は VHTSB を使用した。

4. β -Lactamase 活性

β -Lactamase 活性はマイクロヨード法で測定した³²⁾。

5. 阻害剤の効果判定

1) 増殖阻止法

供試菌株の増殖量は、光電比色計 (Spectronic 20, Milton Roy Company) で波長 550 nm における吸光度を求めて判定した。すなわち、 β -lactam 薬および阻害剤をそれぞれ 0.5 ml ずつ添加した 5 ml VHTSB に供試菌の前培養菌液を接種し、接種 24 時間後の吸光度を測定した。阻害剤は 4 μ g/ml から 2 倍連続希釈法で 0.06 μ g/ml まで希釈した。阻害剤添加から β -lactam 薬添加までの時間は、0～24 時間まで調べた。なお、24 時間後に添加した場合は、接種 48 時間後に吸光度を測定した。

2) 粗酵素活性阻害法

β -Lactamase の粗酵素は、24 時間 VHTSB で培養して得た菌体を江龍らの方法³²⁾で超音波破碎後、遠心し、その上清を用いた。この粗酵素液と阻害剤それぞれ 100 μ l を 1～30 分間、37°C で反応させたのち、その 100 μ l を 1 ml の基質 CEZ 溶液 (100 μ M) に添加した。吸光度の測定は、分光光度計 (U-2000, 日立製作所) を用いて波長 272 nm で 1 分間行った (UV 法)⁴⁰⁾。

β -Lactamase 活性は田中の方法³⁴⁾によって求めた。阻害剤の対照として 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) を使用した。阻害剤の濃度は 0.125, 0.25, 0.5 および 1.0 μ g/ml について検討した。阻害剤による粗酵素活性阻害は阻害剤と粗酵素を反応させた直後から観察されるため、活性阻害率を次式で求めた。

$$\text{活性阻害率 (\%)} = \frac{\text{阻害剤無添加時の活性値} - \text{阻害剤添加時の活性値}}{\text{阻害剤無添加時の活性値}} \times 100$$

3) 阻害剤の効果の計算法

阻害剤の効果は、増殖阻止法では増殖阻止率を、粗酵素活性阻害法では阻害率を求めて判定した。すなわち、次式でそれぞれ計算した。

$$\text{増殖阻止率 (\%)} = \frac{\beta\text{-Lactamase 阻害剤の添加によって吸光度が} \leq 0.2 \text{ に減少した株数}}{\text{供試菌株数}} \times 100$$

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{\text{粗酵素活性が完全に失活した株数}}{\text{供試菌株数}} \times 100$$

4) 相乗効果の判定法

β -Lactam 薬と阻害剤の相乗効果は微量液体希釈法³⁹⁾を応用して求めた。すなわち、1 μ g/ml の阻害剤添加 VHTSB で β -lactam 薬の MIC を、また、25 μ g/ml の β -lactam 薬添加 VHTSB で阻害剤の MIC をそれぞれ測定した。ただし、対照の β -lactam 薬あるいは阻害剤のみで発育しなかった菌株は株数から除外した。

結 果

1. 阻害剤の MIC

供試菌株に対する CVA, SBT および TAZ の MIC は、それぞれ 1～8, 2～4 および 0.06～4 μ g/ml の範囲にほとんど分布していた (Table 1)。

2. PCG, ABPC および CEZ の MIC と β -lactamase 活性

供試菌株に対する PCG, ABPC および CEZ の MIC はすべて ≥ 16 μ g/ml に分布していた。MIC ≥ 256 μ g/ml の高度耐性株が、PCG, ABPC および CEZ でそれぞれ 9, 10 および 11 株認められ、3 薬剤ともに MIC ≥ 256 μ g/ml で発育する菌株は 8 株みられた (Table 2)。

マイクロヨード法で β -lactamase 活性を測定すると、基質 ABPC のとき、No. 13 株と 14 株以外で活性が検出され、その値は 0～137 mU/mg protein, 基質 CEZ のときは全供試菌株で活性が認められ、その値は 3～198 mU/mg protein であった (Table 2)。

3. 増殖阻止法による阻害剤の効果

1) 阻害剤濃度と増殖の関係

β -Lactam 薬 (PCG, ABPC および CEZ) 高度耐性で、分解活性の高い β -lactamase (基質 ABPC と CEZ) を産生する No. 4 株と 3 薬剤に高度耐性を示すが、分解活性の弱い β -lactamase (基質 CEZ) を産生する No.

Table 1 MIC of β -lactamase inhibitors against *Prevotella intermedia*

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	CVA	SBT	TAZ
1	<0.06	<0.06	0.06
2	1	2	1
3	<0.06	<0.06	0.06
4	2	2	2
5	1	2	2
6	2	4	4
7	8	4	4
8	8	4	4
9	2	2	1
10	4	4	2
11	4	4	2
12	2	2	1
13	4	2	2
14	2	2	2

CVA : clavulanic acid, SBT : sulbactam,
TAZ : tazobactam

14 株を用いて、阻害剤の濃度と増殖の関係を調べた。

No. 4 (Fig. 1) と No. 14 (Fig. 2) 株とも薬剤無添加の対照では接種時の吸光度 0.2 が、接種 2 時間まで継続し、誘導期を示した。接種後 2~12 時間に吸光度が著しく増加し、対数増殖期に達した。定常期には接種 12 時間から 24 時間の間に入り、接種後 24 時間まで継続していた。PCG 25 $\mu\text{g/ml}$ 添加の場合、No. 4 株では、対照（薬剤無添加）より増殖は遅れていたが、接種 12 時間以後に急速に増殖し、接種後 24 時間には対照と同じ増殖量を示した。No. 14 株の増殖量は薬剤無添加に類似していた。No. 4 株では阻害剤を 1 $\mu\text{g/ml}$ (1/2 MIC), No. 14 株では、0.25 $\mu\text{g/ml}$ (1/8 MIC) をそれぞれ添加後、吸光度を測定したところ、両菌株とも薬剤無添加とほぼ同等の増殖量を示した。これに対し、前述の阻害剤濃度と PCG 25 $\mu\text{g/ml}$ を混合した場合、両菌株とも増殖は認められず、接種後 24 時間に吸光度は接種直後よりも減少していた。これ以外の阻害剤濃度と PCG 25 $\mu\text{g/ml}$ を混合した場合の結果は Table 3 に示したとおりである。No. 4 株では、阻害剤と PCG 25 $\mu\text{g/ml}$ を混合した場合、阻害剤の 1/4 MIC (0.5 $\mu\text{g/ml}$) でも増殖は阻止されていた。No. 14 株の場合、CVA では、1/32 MIC (0.063 $\mu\text{g/ml}$), SBT と TAZ では、1/16 MIC (0.125 $\mu\text{g/ml}$) で増殖は阻止された。両菌株とも MIC (2 $\mu\text{g/ml}$) および 2MIC (4 $\mu\text{g/ml}$) の阻害剤添加で、増殖が認められる場合は、

Table 2 MIC of β -lactams against *P. intermedia* and their β -lactamase activity

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			β -Lactamase activity (mU/mg protein)	
	PCG	ABPC	CEZ	ABPC ¹⁾	CEZ
1	32	> 256	16	101	92
2	256	> 256	256	133	180
3	32	> 256	16	137	198
4	> 256	> 256	256	117	143
5	> 256	> 256	> 256	52	124
6	> 256	> 256	256	11	20
7	> 256	> 256	> 256	60	175
8	> 256	> 256	> 256	80	70
9	64	16	256	47	87
10	64	128	64	17	41
11	> 256	> 256	> 256	89	96
12	> 256	> 256	> 256	47	86
13	128	64	256	0	3
14	> 256	128	256	0	14

PCG : penicillin G, ABPC : ampicillin, CEZ : cefazolin

¹⁾ β -Lactamase substrates

Fig. 1 Effect of combination of PCG to β -lactamase inhibitors on growth of *P. intermedia* strain No. 4.

PCG : 25 $\mu\text{g/ml}$, β -lactamase inhibitor : 1 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 2 Effect of combination of PCG to β -lactamase inhibitors on growth of *P. intermedia* strain No. 14.

PCG : 25 $\mu\text{g/ml}$, β -lactamase inhibitor : 0.25 $\mu\text{g/ml}$

接種菌量が MIC 測定時よりも多いためである。

2) 添加間隔と増殖の関係

阻害剤効果の持続時間を明らかにするために、阻害剤添加後 PCG 添加までの時間（添加間隔）が発育に及ぼす影響を調べた。1 $\mu\text{g/ml}$ の CVA と TAZ を添加した

VHTSB に No. 4 株と 14 株を接種後 0 から 24 時間後に 25 $\mu\text{g/ml}$ の PCG を添加して増殖阻止（吸光度 ≤ 0.2 ）を観察した。No. 4 株の場合、両阻害剤とも添加間隔 6 時間（対数増殖期初期）まで吸光度が ≤ 0.2 に減少し、増殖阻止が、同 12 時間（対数増殖期後期）では増殖

Table 3 Effect of concentration of β -lactamase inhibitors on growth of *P. intermedia*

Strain	β -Lactamase inhibitors	PCG	Growth (OD _{550nm})							
			0 ¹⁾	0.062	0.125	0.25	0.5	1	2	4
No. 4	CVA	+	1.4	1.3	1.3	1.3	0.1	0.1	0.1	0.1
		-	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.0	0.9
	SBT	+	1.4	1.4	1.4	1.4	0.1	0.1	0.1	0.1
		-	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	0.6
	TAZ	+	1.4	1.4	1.4	1.4	0.1	0.2	0.1	0.1
		-	1.3	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3	1.1	0.1
No. 14	CVA	+	1.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
		-	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3	0.4
	SBT	+	1.3	0.5	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
		-	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3	0.5
	TAZ	+	1.4	1.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
		-	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3	1.3	1.2	0.1

+ : with 25 μ g/ml PCG, - : without PCG¹⁾ Concentration of β -lactamase inhibitors (μ g/ml)

Initial OD : 0.2

Table 4 Effect of time of PCG addition after β -lactamase inhibitor on growth of *P. intermedia*

Strain	β -Lactamase inhibitors	Growth (OD _{550nm})										
		β -Lactamase inhibitor	PCG	β -Lactamase inhibitor + PCG								
				0 ¹⁾	15 ²⁾	30 ²⁾	1 ¹⁾	2 ¹⁾	4 ¹⁾	6 ¹⁾	12 ¹⁾	24 ¹⁾
No. 4	CVA	1.5	1.5	0.17	0.17	0.17	0.16	0.16	0.15	0.16	0.53	1.50
	TAZ	1.3	1.6	0.17	0.22	0.18	0.17	0.15	0.16	0.17	0.29	1.30
No. 14	CVA	1.4	1.5	0.14	0.13	0.14	0.19	0.17	0.15	0.15	0.60	1.40
	TAZ	1.3	1.3	0.15	0.15	0.15	0.14	0.14	0.14	0.15	0.19	0.63

CVA or TAZ : 1 μ g/ml, PCG : 25 μ g/ml

Initial OD : 0.2

¹⁾ Time of PCG addition after β -lactamase inhibitor (hr)²⁾ Time of PCG addition after β -lactamase inhibitor (min)

抑制(吸光度 0.2~0.6)が認められた。No. 14 株の場合、増殖阻止は、CVA では 6 時間(対数増殖期初期)まで、TAZ では 12 時間(対数増殖期後期)までみられ、増殖の抑制は CVA の 12 時間と TAZ の 24 時間(定常期)でそれぞれ観察された(Table 4, Figs. 1, 2)。

3) PCG と阻害剤添加による増殖阻止率

所定濃度の阻害剤を添加した VHTSB に供試菌を接種後 4 時間に 25 μ g/ml PCG を添加して増殖阻止率を求めた。阻害剤無添加の場合、25 μ g/ml の PCG では供試菌の増殖阻止は全く観察されなかった。しかし、0.5~2.0 μ g/ml 阻害剤を添加すると、濃度に応じて増殖阻

止率は上昇した。2 μ g/ml の阻害剤添加のとき、その値は 94~100%であり、阻害剤間での相違はほとんどみられなかった(Table 5)。

4) 経口 β -lactam 薬と阻害剤の組み合わせと増殖の関係

4 種経口 β -lactam 薬(ABPC, CEX, CCL および CFTM)と 3 種阻害剤の組み合わせが *P. intermedia* の増殖に及ぼす影響を No. 4 株と 14 株を用いて、添加間隔 0 と 4 時間で調べた。CVA, SBT および TAZ を 0.5 μ g/ml, ABPC を 25 μ g/ml, CEX と CCL を 50 μ g/ml および CFTM を 6.13 μ g/ml をそれぞれ個々に添加し

Table 5 Growth inhibition percent of *P. intermedia* by combination PCG to β -lactamase inhibitors

	Concentration of β -lactamase inhibitor ($\mu\text{g/ml}$)											
	CVA				SBT				TAZ			
	0	0.5	1.0	2.0	0	0.5	1.0	2.0	0	0.5	1.0	2.0
Growth inhibition percent ¹⁾	0	79	86	94	0	73	86	100	0	86	100	100

Number of *P. intermedia* whose absorbance at OD_{550nm} was 0.2 or less after combination of PCG (25 $\mu\text{g/ml}$) to β -lactamase inhibitors

$$^1) \text{ Growth inhibition percent} = \frac{\text{Number of } P. \text{ intermedia (14 strains) used}}{\text{Number of } P. \text{ intermedia whose absorbance at OD}_{550\text{nm}} \text{ was 0.2 or less after combination of PCG (25 } \mu\text{g/ml) to } \beta\text{-lactamase inhibitors}} \times 100$$

Table 6 Relation between combination of β -lactamase inhibitors to β -lactams and growth of *P. intermedia*

β -Lactamase inhibitors	β -Lactams	Growth (OD _{550nm})							
		Strain No. 4				Strain No. 14			
		β -Lactam ¹⁾	Inhibitor ²⁾	β -Lactam+inhibitor		β -Lactam ¹⁾	Inhibitor ²⁾	β -Lactam+inhibitor	
				0 ³⁾	4 ⁴⁾			0 ³⁾	4 ⁴⁾
CVA	ABPC	1.2	1.3	0.01	0.08	1.2	1.3	0.04	0.04
	CEX	1.2	1.3	0.04	0.06	1.3	1.3	0.02	0.07
	CCL	1.3	1.4	0.03	0.09	1.3	1.3	0.03	0.06
	CFTM	1.3	1.3	0.20	1.20	1.3	1.3	0.04	0.09
SBT	ABPC	1.2	1.3	0.02	0.07	1.2	1.3	0.04	0.10
	CEX	1.2	1.3	0.02	0.05	1.3	1.3	0.03	0.09
	CCL	1.3	1.2	0.05	0.16	1.3	1.3	0.04	0.06
	CFTM	1.3	1.3	0.03	1.30	1.3	1.3	0.03	1.10
TAZ	ABPC	1.2	1.3	0.03	0.09	1.2	1.2	0.03	0.07
	CEX	1.2	1.3	0.04	0.07	1.3	1.2	0.02	0.04
	CCL	1.3	1.2	0.04	0.10	1.3	1.2	0.01	0.05
	CFTM	1.3	1.3	0.03	0.03	1.3	1.2	0.02	0.05

CEX : cephalexin, CCL : cefaclor, CFTM : ceftemam

Concentration of β -lactamase inhibitors and β -lactams : CVA, SBT, TAZ ; 0.5 $\mu\text{g/ml}$, ABPC ; 25 $\mu\text{g/ml}$,

CEX, CCL ; 50 $\mu\text{g/ml}$, CFTM ; 6.13 $\mu\text{g/ml}$

Initial OD : 0.2

た場合、両菌株の吸光度はともに 1.2~1.4 であり、良好な増殖を示した。これに対し、経口 β -lactam 薬と CVA を組み合わせた場合、No. 4 株における CFTM の添加間隔 4 時間の吸光度 1.2 を除くすべての組み合わせの吸光度は ≤ 0.2 であり、増殖は阻止されていた。 β -Lactam

薬と SBT の組み合わせの場合、両菌株における CFTM の添加間隔 4 時間の吸光度は 1.1~1.3 を示したが、これら以外の組み合わせでの吸光度はすべて ≤ 0.2 であった。 β -Lactam 薬と TAZ の組み合わせの場合は、CVA, SBT とは異なり、いずれの組み合わせとも増殖は阻止さ

Table 7 Effect of incubation time of crude enzyme with β -lactamase inhibitor on the activity of β -lactamase

Strain	β -Lactamase inhibitors	Fraction of inhibited enzyme activity ¹⁾			
		0 ²⁾	5	10	30
No. 3	CVA	24	96	100	100
	SBT	27	96	100	100
	TAZ	65	90	100	100
No. 4	CVA	0	100	100	100
	SBT	7	100	100	100
	TAZ	3	100	100	100

(%)

Concentration of β -lactamase inhibitors : 1 $\mu\text{g/ml}$ ¹⁾ Fraction of inhibited enzyme activity (%)

$$= \frac{\text{Activity of enzyme without inhibitor} - \text{Activity of enzyme with inhibitor}}{\text{Activity of enzyme without inhibitor}} \times 100$$

²⁾ Incubation time (min)

れていた (Table 6)。

4. 粗酵素活性阻害法による阻害剤の効果

1) 反応時間と粗酵素活性の関係

分解活性の高い β -lactamase (基質 CEZ と ABPC) を産生する No. 3 株と 4 株から抽出した粗酵素液を使用した。阻害剤による粗酵素活性阻害は阻害剤添加直後から認められ, No. 3 株由来酵素の活性阻害率は CVA で 24%, SBT で 27% および TAZ で 65% であった。しかし, No. 4 株由来粗酵素のそれはいずれも 7% 以下であった。反応 5 分後には両菌株由来粗酵素活性は 3 種阻害剤で 90% 以上阻害され, 同 10 分以降では 100% 阻害されていた (Table 7)。

2) 阻害剤濃度と粗酵素活性の関係

No. 4 株から抽出した粗酵素液を用いて, 酵素活性に及ぼす阻害剤濃度の影響を反応 5 分後に調べた。活性阻害率は CVA, SBT および TAZ ではそれぞれ 68~94, 60~88 および 75~99% であり, 濃度に依存する傾向を示した (Table 8)。

3) 阻害率

両基質に対する分解活性の高い β -lactamase を産生する 9 菌株 (No. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 13 および 14) を選び使用した。これら菌株より抽出した粗酵素液と 1 $\mu\text{g/ml}$ 阻害剤を反応させ, 10 分後における阻害率を求めた。その値は CVA, SBT および TAZ でそれぞれ 89, 89 および 100% であった。

Table 8 Effect of concentration of β -lactamase inhibitors on the activity of β -lactamase

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Fraction of inhibited enzyme activity ¹⁾		
	CVA ²⁾	SBT	TAZ
0.125	68	60	75
0.25	88	88	90
0.5	94	88	99
1	89	83	90

(%)

Incubation time : 5 min

¹⁾ Fraction of inhibited enzyme activity (%)

$$= \frac{\text{Activity of enzyme without inhibitor} - \text{Activity of enzyme with inhibitor}}{\text{Activity of enzyme without inhibitor}} \times 100$$

²⁾ Inhibitors

5. β -Lactam 薬と阻害剤の相乗効果

1) 阻害剤添加による β -lactam 薬の MIC の減少

阻害剤無添加時の PCG, ABPC, PIPC, CEX, CCL, CEZ, CPZ および CFTM の MIC は $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ にほとんど分布していた (Fig. 3)。これに対し, 1 $\mu\text{g/ml}$ の CVA, SBT および TAZ を添加すると, 各 β -lactam 薬の MIC は $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ にすべて分布し, 無添加の場合に比べて MIC は著しく減少した。減少の程度は菌株によって異なるが, 256 分の 1 以下に達した菌株も認められた。また, 3 種阻害剤と 8 種 β -lactam 薬をそれぞれ

MIC of β -lactams ($\mu\text{g/ml}$)	CVA								SBT								TAZ							
	PCG	ABPC	PIPC	CEX	CCL	CEZ	CPZ	CFTM	PCG	ABPC	PIPC	CEX	CCL	CEZ	CPZ	CFTM	PCG	ABPC	PIPC	CEX	CCL	CEZ	CPZ	CFTM
>256	8	10	5		7	5		1																
256	1		3	1	3	6		4																
128	1	2		2	1		1	3																
64	2	1	2	2		1	6	1																
32	2		1	2																				
16		1		2	1	2	3		1															
8								3																
4			2	2	1		2			1			2											
2			1					2																
1				1				2																
0.5				2	1																			
0.25								2																
≤ 0.13									1	1	5		7	2		6								
	6	5	6	12	4	5	12	6	4	2	4	12	2	6	8	5	5	5	6	11	3	7	9	6

Fig. 3 Effect of combination of β -lactam to β -lactamase inhibitor on MIC of β -lactams against β -lactamase producers of *P. intermedia*.

PIPC : piperacillin, CPZ : cefoperazone

β -lactamase inhibitors : 1 $\mu\text{g/ml}$

MIC of β -lactamase inhibitors ($\mu\text{g/ml}$)	CVA								SBT								TAZ									
	-	+ PCG	+ ABPC	+ PIPC	+ CEX	+ CCL	+ CEZ	+ CPZ	+ CFTM	-	+ PCG	+ ABPC	+ PIPC	+ CEX	+ CCL	+ CEZ	+ CPZ	+ CFTM	-	+ PCG	+ ABPC	+ PIPC	+ CEX	+ CCL	+ CEZ	+ CPZ
8		2	1																							
4		3	1																							
2		5	1			2																				
1		2		1		4																				
0.5			1	3		1	2	1																		
0.25			3	5	4	2	1	2																		
0.13			1	1	4	6	1	1	6																	
0.06				1	2	1		4	2	6																
≤ 0.03		2	5	2	3	3	3	5	4	7																

Fig. 4 Effect of combination of β -lactamase inhibitors to β -lactam on MIC of β -lactamase inhibitor against β -lactamase producer of *P. intermedia*.

- : without β -lactams, + : with β -lactams (25 $\mu\text{g/ml}$)

混合した場合の MIC_{90} はいずれも $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 3)。

2) β -Lactam 薬添加による阻害剤の MIC の減少

β -Lactam 薬無添加の場合の CVA, SBT および TAZ の MIC のほとんどは $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ に分布していた。25 $\mu\text{g/ml}$ の各種 β -lactam 薬を添加すると、TAZ の MIC はすべて $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ に減少していた。CVA の場合、PCG と CCL, SBT の場合 ABPC と CCL の一部の菌株を除くと、ほとんどの MIC は $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ に分布していた (Fig. 4)。

6. β -Lactamase 抵抗性 β -lactam 薬の MIC

β -Lactamase 産生 *P. intermedia* に対する CPZ, CFTM, CMZ, LMOX, IPM および AZT の MIC を測定した。その結果、IPM を除く 5 薬剤の MIC は 0.5~256 $\mu\text{g/ml}$ にほとんど分布し、 MIC_{90} は CPZ, CFTM, CMZ, LMOX および AZT でそれぞれ 64, 256, 16, 128 および 64 $\mu\text{g/ml}$ であった。IPM の MIC_{90} は $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ と小さかった (Fig. 3, Table 9)。

Table 9 MIC distribution of β -lactams which are considered to be stable to β -lactamase against β -lactamase producers of *P. intermedia* (14 strains)

β -lactams	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
CMZ	3	2			2	2	5				16
LMOX		1		3		1		2	1	6	128
IPM	13				1						≤ 0.25
AZT		1	1		2	5	2		3		64

CMZ: cefmetazole, LMOX: latamoxef, IPM: imipenem, AZT: aztreonam

考 察

近年、 β -lactam 薬に耐性を示す細菌の分離頻度が増加し、臨床的にも問題となっている^{6,9,15-17,41-43}。これら臨床分離耐性菌の中で、 β -lactamase 産生株の割合は増加し^{6,9,15-17,41-43}、産生される β -lactamase も多様である^{19,44}。

ヒト口腔常在菌叢においても *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. oralis*, *B. bivius*, *B. disiens*, *B. capillosus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter* sp., *Eikenella corrodens* などから β -lactamase が抽出され、その性状が検討されている^{19,32,34,45-48}。*P. intermedia* 由来 β -lactamase は oxyiminocephalosporinase (CXase) または type C cephalosporinase (CEPase) と推定されている^{32,34}。

阻害剤は自身も抗菌性を示すが、 β -lactam 薬と混合すると競合的あるいは不可逆的に β -lactamase 活性を阻害し、その結果 β -lactam 薬の抗菌性を安定化させている。CVA は penicillinase (PCase)²⁰ を、SBT は PCase と CEPase^{21,22} を、TAZ は PCase と CXase および一部の CEPase の活性を阻害する²⁷と述べられている。

本研究に供試した 14 株の β -lactamase 産生 *P. intermedia* は PCG, ABPC および CEZ に対する感受性が低く (いずれかの MIC が $\geq 256 \mu\text{g/ml}$)、IPM と CMZ を除く供試 β -lactam 薬間で交叉耐性を示した。しかし、供試菌株由来 β -lactamase 活性は菌株によって異なっていた。さらに、*P. intermedia* のある株では、(1) 投与された β -lactam 薬によって β -lactamase 高度産生性の β -lactam 薬高度耐性株に *in vitro* で移行すること¹⁴、(2) *in vitro* で耐性因子を伝達すること³³、(3) 産生した β -lactamase によって病巣中の β -lactam 薬を分解し、混合感染した他の口腔常在細菌の生存を保障する間接病原性を示す可能性のあること^{5,49}などが明らかにされて

いる。このように菌性感染症から分離される *P. intermedia* は感染症の治療において注目すべき細菌と考えられる。

増殖阻止法で β -lactamase 産生 *P. intermedia* に対する 3 種阻害剤と PCG の相乗効果を検討した結果、いずれの組み合わせでも供試菌の増殖は単独の薬剤の場合よりも両薬剤を混合した場合に強く阻止され、相乗効果が認められた。相乗効果が観察される阻害剤の最小濃度は菌株の β -lactamase 産生量および増殖した菌量によって異なる⁵⁰。しかし、供試菌株の増殖阻止率は阻害剤の濃度に依存し、 $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ の阻害剤で供試菌の $\geq 81\%$ の増殖が阻止された。

また、相乗効果は阻害剤と PCG を同時に混合した場合から、阻害剤添加 6~12 時間後 (接種後 6~12 時間対数増殖期) に PCG を添加しても抗菌性が認められ、阻害剤の効果は持続するものと考えられる⁵¹。

増殖阻止法による相乗効果は β -lactamase 活性が阻害された結果生じたことを証明するために、抽出した粗酵素液を用いて活性阻害実験を行った。 $1 \mu\text{g/ml}$ の阻害剤と粗酵素液を 5 分間以上反応させると、粗酵素活性は 3 種阻害剤とともに阻害された。この傾向は阻害剤の濃度を $0.13 \mu\text{g/ml}$ に減少させても認められた。9 菌株由来粗酵素液を用いて阻害率を求めると、反応 10 分後に TAZ では 100%、SBT と CVA では 89%であった。以上のように、*P. intermedia* の β -lactamase 活性は供試阻害剤によって阻害されると考えられる。

ついで、歯科領域で頻繁に使用されている経口 β -lactam 薬と阻害剤の相乗効果を増殖阻止法で検討した。3 種阻害剤と ABPC, CEX および CCL を混合してから供試菌を接種しても、阻害剤添加後接種し、接種 4 時間後にこれら β -lactam 薬を添加しても、供試菌の増殖は阻止され相乗効果が認められた。しかし、CFTM の場合、阻害剤を接種前に混合したとき、3 種阻害剤とも供試菌の増殖阻止がみられた。阻害剤添加後供試菌を接種し、

同4時間後に CFTM を添加すると TAZ では増殖阻止がみられたが、CVA と SBT では増殖阻止はみられなかった。これらの事実は、経口 β -lactam 薬の種類によって阻害剤との相乗効果に若干の相違はみられるが、経口 β -lactam 薬と阻害剤を配合すると β -lactamase 産生 *P. intermedia* の増殖が阻止されることを示唆している。

さらに、相乗効果を明確にするために3種阻害剤と8種 β -lactam 薬 (PCG, ABPC, PIPC, CEX, CCL, CEZ, CPZ および CFTM) との間で MIC を微量液体希釈法で検討した。 β -Lactam 薬のみの添加では、供試菌に対する MIC は $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ にほとんど分布し、MIC $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ にも多数の MIC が分布していた。しかし、 $1 \mu\text{g/ml}$ の阻害剤を混合後供試菌を接種すると、3種阻害剤とも β -lactam 薬の MIC は $8 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布し、MIC が 256 分の 1 以下に低下した菌株もみられた。逆に β -lactam 薬の濃度を一定にして阻害剤の MIC を求めたところ、 β -lactam 薬に阻害剤を添加した場合と同様に、3種阻害剤の MIC は減少した。このように阻害剤と供試 β -lactam 薬の合剤は、 β -lactamase 産生 *B. fragilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* などに対して相乗効果を示す²⁰⁻³¹⁾のと同様に、 β -lactamase 産生 *P. intermedia* に対しても著しく高い相乗効果を示すものと推定される。

供試菌株に対する β -lactamase 抵抗性 β -lactam 薬の MIC₉₀ と、阻害剤と β -lactam 薬を混合した場合の MIC₉₀ を比較すると、合剤の MIC₉₀ は、IPM の MIC₉₀ ($\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$) よりは大きかったが、CMZ, LMOX および AZT の値よりは小さかった。

以上の事実は、阻害剤が *P. intermedia* 由来 β -lactamase 活性を阻害した結果、 β -lactam 薬は供試菌の増殖を阻止することを示唆している。したがって、阻害剤と歯科領域で使用頻度の高い経口 β -lactam 薬 (ABPC, CEX, CCL および CFTM) を混合すると、歯性感染症を難治化させる β -lactamase 産生 β -lactam 薬耐性菌に対する抗菌効果を高めることができると推定される。

結 論

本研究は β -lactamase 産生菌に起因する歯性感染症の治療成績を高めるために、 β -lactamase 阻害剤に関する基礎的な研究を行うことを目的としている。閉鎖性膿瘍由来 β -lactamase 産生 *P. intermedia* 14 株と3種阻害剤を用いて阻害効果を細胞増殖系と酵素レベルで検討し、以下の結論を得た。

1. 供試菌株に対する CVA, SBT および TAZ の MIC はそれぞれ $1 \sim 8$, $2 \sim 4$ および $0.06 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ の範囲にほとんど分布していた。

2. 供試菌株に対する PCG, ABPC および CEZ の MIC は $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ に分布し、3薬剤間で交叉耐性がみられた。

3. 供試菌株の β -lactamase 活性は基質 ABPC のとき、 $0 \sim 137 \text{ mU/mg protein}$, CEZ のとき、 $3 \sim 198 \text{ mU/mg protein}$ であった。

4. 増殖阻止法で阻害剤の増殖阻止率を調べると、阻害剤の濃度に応じてこの値は大きくなり、 $2 \mu\text{g/ml}$ 添加の場合 CVA では 94%, SBT と TAZ では 100% であった。

5. 阻害剤の相乗効果は添加間隔 (接種後) 6~12 時間まで観察された。

6. 粗酵素活性阻害法で阻害率を求めると、 $1 \mu\text{g/ml}$ の阻害剤添加で、CVA と SBT では 89%, TAZ では 100% であった。

7. 微量液体希釈法での阻害剤と β -lactam 薬の相乗効果は、供試した経口 β -lactam 薬の ABPC, CEX, CCL および CFTM の間で認められた。

8. 供試 β -lactam 薬に阻害剤を添加した場合の MIC₉₀ は、IPM の MIC₉₀ を除く残りの供試 β -lactam 薬のそれより小さかった。

9. 以上のことから、阻害剤と経口 β -lactam 薬の合剤は β -lactamase 産生菌に起因する歯性感染症の治療に有効であると推定した。

稿を終わるに当たり、ご懇篤なるご校閲を賜りました大阪歯科大学細菌学講座 佐川寛典教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行に当たりさまざまなご助力をいただきました同臨床歯科学研究所 大宮真紀助手に厚く御礼を申し上げます。また、ご援助をいただきました細菌学教室各位ならびに抗生物質をご提供下さいました各製薬会社に御礼申し上げます。

なお、本研究の一部は大阪歯科大学歯学中央研究所低温実験施設を使用して行ったものであり、関係者に謝意を表します。

本論文の要旨は第 445 回大阪歯科学会例会 (1995 年 12 月, 大阪市) および第 69 回日本細菌学会総会 (1996 年 3 月, 福岡市) において発表した。

文 献

- 1) 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.

- 2) 岡本一起子, 米谷裕之, 北條博一, 井上純一, 諸井英徳, 青木敦子, 尾上孝利, 福島久典, 佐川寛典, 黒田洋生 : 口底蜂巣炎から分離された細菌の同定. 日口腔診誌 4 : 174~179, 1991.
- 3) Brook, I., Frazier, E. H. and Gher, M. E. : Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. Oral Microbiol. Immunol. 6 : 123~125, 1991.
- 4) Wade, W. G., Gray, A. R., Absi, E. G. and Barker, G. R. : Predominant cultivable flora in pericoronitis. Oral Microbiol. Immunol. 6 : 310~312, 1991.
- 5) 多々見敏章 : 歯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.
- 6) 木下 智, 尾上孝利, 大宮真紀, 杉原圭子, 松本和浩, 多々見敏章, 栗林信仁, 山本憲二, 村田雄一, 石川英雄, 真下尚人, 佐川寛典, 白数力也 : 歯性感染症から分離した細菌の β -lactam 薬感受性. 日化療会誌 43 : 1025~1030, 1995.
- 7) Lewis, M. A. O., Carmichael, F., MacFarlane, T. W. and Milligan, S. G. : A randomised trial of coamoxiclav (Augmentin®) versus penicillin V in the treatment of acute dentoalveolar abscess. Br. Dent. J. 175 : 169~174, 1993.
- 8) 木下 智, 尾上孝利, 大宮真紀, 杉原圭子, 松本和浩, 多々見敏章, 栗林信仁, 山本憲二, 村田雄一, 石川英雄, 糸永雄二郎, 佐川寛典, 白数力也 : 歯性感染症から分離した *Prevotella intermedia* の β -lactam 薬感受性と β -lactamase 活性. 日化療会誌 43 : 1099~1103, 1995.
- 9) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 鈴木由美子, 深山成美, 石原理加, 小田清次 : 臨床分離 *Prevotella* spp. の β -ラクタマーゼ産生株の割合と薬剤感受性. 第 25 回嫌気性菌感染症研究講演抄録 : 18, 1994 (抄録).
- 10) Legg, J. A. and Wilson, M. : The prevalence of beta-lactamase producing bacteria in subgingival plaque and their sensitivity to Augmentin®. Br. J. Oral Maxillofac. Surg. 28 : 180~184, 1990.
- 11) Jacobs, M. R., Spangler, S. K. and Appelbaum, P. C. : Susceptibility of *Bacteroides non-fragilis* and fusobacteria to amoxicillin, amoxicillin/clavulanate ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9 : 417~421, 1990.
- 12) Fujii, R. : Changes in antibiotic consumption in Japan during the past 40 years. Jpn. J. Antibiotics 37 : 2261~2270, 1984.
- 13) Moellering, R. C. Jr. : Interaction between antimicrobial consumption and selection of resistant bacterial strains. Scand. J. Infect. Dis. 70 (Suppl.) : 18~24, 1990.
- 14) 田中裕之, 尾上孝利, 北條博一, 岡 健司, 姜 奎錫, 佐川寛典, 黒田洋生 : 口腔感染症由来 *Pervotella intermedia* における β -lactam 剤高度耐性株の選択と β -lactamase 活性の誘導. 日口腔診誌 8 : 291~297, 1995.
- 15) 横田 健 : 臨床分離菌の β -lactamase 産生率と各種薬剤に対する感受性の検討. Chemotherapy 39 : 941~952, 1991.
- 16) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 中根 豊, 鈴木由美子, 深山成美, 石原理加, 小田清次 : 気道の常在細菌叢が産生する β -ラクタマーゼに関する検討 第一報 上気道. Chemotherapy 39 : 961~967, 1991.
- 17) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 鈴木由美子, 深山成美, 石原理加, 小田清次, 田中節子, 中根 豊 : 近年に検出した臨床分離株の β -ラクタマーゼ産生性. Jpn. J. Antibiotics 48 : 421~426, 1995.
- 18) Nord, C. E. : Mechanisms of β -lactam resistance in anaerobic bacteria. Rev. Infect. Dis. 8 (S-5) : S543~S548, 1986.
- 19) Appelbaum, P. C., Philippon, A., Jacobs, M. R., Spangler, S. K. and Gutmann, L. : Characterization of β -lactamases from non-*Bacteroides fragilis* group *Bacteroides* spp. belonging to seven species and their role in β -lactam resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 34 : 2169~2176, 1990.
- 20) Reading, C. and Cole, M. : Clavulanic acid : a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents Chemother. 11 : 852~857, 1977.
- 21) English, A. R., Retsema, J. A., Girard, A. E., Lynch, J. E. and Barth, W. E. : CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams : initial bacteriological characterization. Antimicrob. Agents Chemother. 14 : 414~419, 1978.
- 22) Fu, K. P. and Neu, H. C. : Comparative inhibition of β -lactamases by novel β -lactam compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 15 : 171~176, 1979.
- 23) Aronoff, S. C., Jacobs, M. R., Jøhanning, S. and Yamabe, S. : Comparative activities of the β -lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. Antimicrob. Agents Chemother. 26 : 580~582, 1984.

- 24) 西野武志, 中沢季美, 大槻雅子, 谷野輝雄: Sulbactam と Cefoperazone の併用による *in vitro* 抗菌作用について. *Chemotherapy* **32**(S-4): 51~65, 1984.
- 25) Appelbaum, P. C., Jacobs, M. R., Spangler, S. K. and Yamabe, S.: Comparative activity of β -lactamase inhibitors YTR 830, clavulanate, and sulbactam combined with β -lactams against β -lactamase-producing anaerobes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**: 789~791, 1986.
- 26) 西野武志, 笠井隆夫, 大槻雅子, 森下睦子, 藤本千代子, 谷野輝雄: BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について. *Chemotherapy* **34**(S-4): 51~68, 1986.
- 27) Higashitani, F., Hyodo, A., Ishida, N., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Inhibition of β -lactamases by tazobactam and in-vitro antibacterial activity of tazobactam combined with piperacillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**: 567~574, 1990.
- 28) Wexler, H. M., Molitoris, E. and Finegold, S. M.: Effect of β -lactamase inhibitors on the activities of various β -lactam agents against anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1219~1224, 1991.
- 29) Maddux, M. S.: Effects of β -lactamase-mediated antimicrobial resistance: the role of β -lactamase inhibitors. *Pharmacotherapy* **11**: 40S~50S, 1991.
- 30) 東谷房広, 三橋 進, 井上松久: Tazobactam/Piperacillin の細菌学的評価. *Chemotherapy* **42**(S-2): 1~25, 1994.
- 31) Stapleton, P., Wu, P. J., King, A., Shannon, K., French, G. and Phillips, I.: Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2478~2483, 1995.
- 32) 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.
- 33) 木下 智: 菌性感染症における細菌の β -lactam 薬耐性化に関する研究. *日化療会誌* **44**: 136~142, 1996.
- 34) 田中裕之: *Prevotella intermedia* β -lactamase の精製と性状. *日口腔診誌* **9**: 69~78, 1996.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R. Jr., Janda, W. M., Sommeers, H. M. and Winn, W. C. Jr.: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 3rd ed, pp. 393~471, J. B. Lippincott, Philadelphia, 1988.
- 38) 田中信男, 中村昭四郎: 抗生物質大要, 第4版, pp 31~61, 東京大学出版会, 東京, 1992.
- 39) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告 (1989年): 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.
- 40) Waley, S. G.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* **139**: 789~790, 1974.
- 41) 渡辺 登, 森田耕司, 蔵田 訓, 金森政人, 岡崎充宏, 宿谷菜穂子, 浅野紀子, 山岸郁子: 各種材料から分離された *Bacteroides fragilis* group の菌種別分離頻度と薬剤耐性. *嫌気性菌感染症研究* **23**: 81~85, 1993.
- 42) 斎木康正, 中川清昌, 山本悦秀: 口腔外科領域閉塞膿瘍からの検出菌の β -lactamase 活性とその薬剤感受性. *日化療会誌* **42**: 987~996, 1994.
- 43) 佐々木 緊, 長野 馨, 木村美司, 地主 豊, 永田弘, 魚谷幸一, 東山伊佐夫: 種々の臨床分離株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス. *日化療会誌* **43**: 12~26, 1995.
- 44) Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A.: More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1697~1704, 1991.
- 45) Tuner, K., Liniqvist, L. and Nord, C. E.: Purification and properties of a novel β -lactamase from *Fusobacterium nucleatum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 943~947, 1985.
- 46) Foweraker, J. E., Hawkey, P. M., Heritage, J. and Van Landuyt, H. W.: Novel β -lactamase from *Capnocytophaga* sp.. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 1501~1504, 1990.
- 47) Lacroix, J. M. and Walker, C.: Characterization of a β -lactamase found in *Eikenella corrodens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 886~891, 1991.
- 48) Bush, K., Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A.: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1211~1233, 1995.
- 49) Stefani, S., Pellegrino, M. B., Russo, G. and Nicoletti, G.: Direct and indirect pathogenicity of

- β -lactamase-producing bacteria in respiratory tract infection in children. *Drugs* **42** (S-4) : 14~18, 1991.
- 50) 中沢 久, 井上松久, 三橋 進 : BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の抗菌作用およびクラバン酸の生菌中 β -lactamase に対する阻害効果について. *Chemotherapy* **34**(S-4) : 1~18, 1986.
- 51) 横田 健, 東 映子, 鈴木映子 : Sulbactam と Cefoperazone 合剤の各種細菌臨床分離株に対する抗菌力. *Chemotherapy* **32**(S-4) : 1~10, 1984.