Bacteroidesの病原性に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮本, 博一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9089

金沢大学十全医学会雑誌　第92巻　第5号　674－688　(1983)

Bacteroides の病原性に関する研究

金沢大学医学部歯科口腔外科学教室（主任：玉井健三教授）

宮　本　博　一

（昭和58年10月5日受付）

口腔由来の *Bacteroides* の病原性を検討するため，まず，*B. fragilis* 1010 の標準株を使用して基礎実験を行った．TF 培地の 48 時間培養液の 0.2 ml をマウス尾静脈に注射したところ，10 匹中 6 匹のマウスの斃死を起した．この毒性は 115°C，15 分の加熱によって不活化されなかった．元来，*Bacteroides* 単独の病原性はよく知られていないので，弱いながらも致死性をもつこの毒素がどの画分にあるかについて更に検討した．培養液を 4°C下で 20 分，1300×G で遠心し，上清液と沈渣に分けた．その上清液には全く毒性を見ることはできなかった．しかし，菌体を超音波処理し，これをマウスの尾静脈に 0.2 ml 注射したところ，この時致死毒性を認め，その LD_{50}は 5.35 mg であった．次に家兎に対する発熱性を調べたが，最少量 3.1 mg/kg を必要とした．更に，この超音波処理菌の Shwartzman 活性を検討した．予備注射量として 2，4，8，16 mg/0.2ml を注射し，惹起液として 16 mg の超音波処理菌を用いたが，反応は陰性であった．しかし，惹起注射液として，*E. coli*-LPS 0.2 mg を注射した際，4，8，16 mg で反応陽性を示した．

以上の実験に基づき，*B. fragilis, B. thetaiotaomicron, B. melaninogenicus, B. distasonis, B. oralis* などの口腔内由来の *Bacteroides* 12 株および教室保存株 9 株を併せ用いて，Shwartzman 反応を試験した．結果は，*Bacteroides* species の如何を問わず，全ての菌株に Shwartzman 反応は陽性であった．

以上の所見から，*Bacteroides* species の病原性は内毒素に類似した物質によるものであると考えられる．

Key words Anaerobes, *Bacteroides fragilis*, Pathogenicity, Endotoxin like substance.

口腔領域の感染症は日常臨床において，しばしば遭遇する疾患であるが，その起因菌の大部分は一般には，弱毒菌あるいは非病原菌とされている常在菌である[1]．口腔内には多種多様の常在菌が存在しており，ヒトの唾液中の総菌数は 1 ml 当りほぼ 10^8cells 存在するとされている[2]．通常は宿主側の防禦機構と常在菌の病原活性とのバランスが保たれているが，宿主側の要因や微生物側の菌数の増加あるいは病原活性の変化により，常在菌が容易に opportunistic infection の起因菌として重要な役割を演じている[3)~6)]．

近年，嫌気培養法の確立により嫌気性菌による感染症が注目され，口腔領域でも嫌気性菌の単独感染症例あるいは混合感染症例が多くなってきている．時として重篤な症状を呈する症例があり，その際の起因菌のほとんどは，弱毒菌または非病原菌と従来みなされてきた常在性嫌気性菌であると報告されている[7]．しかし，臨床において最近，特に注目されているグラム陰性嫌気性桿菌である *Bacteroides* の病原性について実験するうちに，*Bacteroides* の培養液にマウス致死毒が含まれる事実に遭遇した．*Bacteroides* の培養液が，毒性を示す実験は過去見られたことがないので，本報ではこの毒性を確認する目的で，種々の実験をおこなった．また，さらに臨床から得られた菌株についても病原性について検討した．

材料および方法

1．実験動物

生後 6～7 週齢（約 20～25 g）の雄の ddy 系マウス，生後 8～9 週齢（約 250 g）の雄の Wistar 系ラットおよび生後 11～12 週齢（約 2 kg）の雄の家兎を実験に使用した．

2．使用菌株

Studies on the Pathogenicity of *Bacteroides*. **Hirokazu Miyamoto,** Department of Dento-Oral Surgery (Director: Prof. Kenzo Tamai), School of Medicine, Kanazawa University.

岐阜大学医学部微生物学教室から分与された，*B. fragilis* 7000, 7001, 7002, 7004, 7008, 1010, *B. thetaiotaomicron* 7005, 7006, *B. distasonis* 7007 および *B. oralis* 7010 と当教室で最近，口腔内より分離・同定した *B. fragilis* KT-32, 33, 34, KI-3, 5, 11, 14, 22, 23, SI, T-28, および *B. melaninogenicus* KK-1 の計22株を実験に供した．

3．使用培地

実験に使用した培地は従来より当教室で口腔内嫌気性菌分離用培地として使用してきた玉井・福田培地[8]（TF medium・日水）を使用した．

4．*B. fragilis* の培養液の接種法

TF medium（中試験管中に 15 ml）で2回 37°C・48時間継代培養した後，TF 血液平板培地に塗沫し，そのコロニーを更に，single colony isolation した菌を使用した．さらに，TF medium（中試験管中に 15 ml）に 37°C・48 時間前培養後，その 1 ml ずつを 30 ml 容量の6本の投薬ビン（30 ml の TF 培地が分注されている.）に移植し，37°C で 12, 24, 48, 72, 96, 120 時間それぞれ本培養した．その培養液をマウスの尾静脈に 0.2 ml 接種し，3日後の致死率を求めた．その際，48 時間培養液を接種後，死亡したマウスを剖検し，各臓器中の細菌学的検索も併せおこなった．

5．菌数測定法

B. fragilis の各時間ごとの培養液中の生菌数測定は，平板稀釈法[9]によって算出した．

6．*B. fragilis* の培養液の処理法

上記の方法に従って継代培養をくり返した菌を用いた．この 3 ml を 100 ml の *TF* 培地（100 ml の bottle 中に分注）に移植し，37°C，12 時間前培養し，この 30 ml を 1000 ml の TF 培地（1000 ml 容量の bottle に分注）に，さらに移植し，37°C48 時間培養した（TF 培地はすべて agar ぬきのものを用いた）．この培養液を 1,300×G・20 分間，4°C下で冷却遠心し，その上清液に toluene を 10%の割合に加えて充分振盪し，一夜 4°C下に静置した．その後滅菌蒸留水を湿らせた濾紙で濾過して toluene を除去し，マウスの尾静脈に 0.5 ml 接種し，3日後の致死率を求めた．この実験の上清液作製はすべて無菌操作で実施した．

7．超音波処理菌の作製法

先の操作で得られた沈査を滅菌生食水で洗滌後，滅菌生食水 50 ml を加え超音波処理器（Ultrasonic disruptor, Model UR 200 P, TOMY SEIKO）で 145 w/20KHz・1 分間，間欠的に 20 分菌体破壊を行った．この液を 10.000×G・20 分間，4°C下で冷却遠心し，上清液を凍結乾燥して粉末とし実験に供した．実験の使用に際しては，凍結乾燥した超音波処理菌を滅菌生食水に懸濁し，マウスの尾静脈に 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mg を各群 20 匹づつ接種し，3日後の致死率を求めた．なお，超音波処理による菌体破砕率は約 95%であった．

8．ラット皮下接種による皮膚変化

ラットの背面を動物用バリカンで剃毛し，メタノールで消毒後，剃毛部に超音波処理菌を滅菌生食水で懸濁した 2.5, 5, 10, 15, 20 mg 溶液を皮下接種し，経日的に皮膚の変化を 14 日間観察した．

9．発熱性試験

発熱性物質試験法[10]に準じて施行した．1群3匹の家兎を使用し，注射の前々日，前日に直腸温を測定し，当日は注射前 1，2，3時間と直前に検温した．安静時を control とし，体重 1 kg 当り 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5 mg の各濃度の処理菌を 2.0 ml の滅菌生食水に懸濁し，約 2 kg の家兎の耳縁静脈に接種後，1時間おきに 6 時間まで経時的に検温した．3匹中2匹以上が対照と比較して 0.6°C以上の温度上昇したものを発熱陽性と判定し，その最少量を体重 1 kg 当りの重量で求めた．

10．Shwartzman 反応に使用する超音波処理菌（準備液）の作製法

100 ml 容量の投薬ビンに TF medium 100 ml を入れ，前培養した菌液 3 ml を移植し，37°C・24 時間ないし 48 時間培養した．上記同様，超音波処理したものを凍結乾燥しないで直ちに 10.000×G・20 分間，4°C下で冷却遠心後，その上清液を Shwartzman 反応用準備液として実験に供した．

成　　績

1．*B. fragilis* 1010 の培養時間による致死率

B. fragilis 1010 の培養時間とマウスの致死率を，1群 10 匹で検討した．結果は表1に示すごとく，12 時間培養液の 0.2 ml をマウスの尾静脈に接種したところ，10 匹中 1 匹を死に至らしめた．ついで 24 時間培養液を接種したマウスの致死率は 40%となり，さらに 48 時間培養液では，致死率は 60%と実験群の中で最高値を示した．しかし，72 時間培養液を接種した群の致死率は，40%と低下した．96 時間培養液では，致死率は 20%，120 時間培養液では 10%と低下した．

この培養液中に含まれる毒性の耐熱性について検討した．48 時間培養の 7.8×10^7cells/ml の生菌数を含む菌液で 10 匹のマウスに静脈注射し，7 匹死亡させたものを 115°C，15 分加熱して，さらに，10匹のマウスに注射し，その内 5 匹の生存を認め，熱によって inactivation されることはないことが判明した．

上記の各々の培養時間でその生菌数を測定したとこ

ろ，12時間培養液中の生菌数は5.8×10^8/0.2 ml，24時間では3.0×10^8/0.2 ml，48時間では2.2×10^7/0.2 mlであった．72，96，120時間では，各々4.8×10^6/0.2 ml，4.4×10^6/0.2 ml，6.8×10^5/0.2 mlと培養時間の経過とともに生菌数は低下している成績であった．

以上の実験成績から，致死率と生菌数の間には明らかな相関関係は見られず，bacteremiaよりむしろ菌体内毒素によるマウスの死を暗示した．

しかし，先ず最初にbacteremiaについて検討した．48時間培養した培養液の0.2 ml，生菌数1.6×10^6を接種し，24時間以内に死亡したマウスの心臓血を採取し，生菌数を測定したところ，1.1×10^7/mlと増菌していた．したがってbacteremiaも見られることが判明した．可及的無菌的に採取した心臓，肝，腎，腸管，大腿筋からも*Bacteroides*を検出した．なお，マウスは培養液の接種後，毛は逆だって毛並みが悪くなり，運動性も低下し，食欲も不良となった．死亡したマウスはほとんどが24時間以内に死亡したが，生存したマウスは2日目以後より次第に回復し，3日目には正常な状態であった．また，培養時間の差とマウスの死亡状態には何ら変化はなかった．

2．培養液の病原性

先述の実験で，その致死原因が培養菌の菌体成分にあるのではないかと推測し，次の実験をおこなった．すなわち，*B. fragilis* 1010をTF medium(agarぬき)に37°C・48時間培養し，その培養液を1群50匹のマウスの尾静脈に0.5 ml接種し，52%の高い致死率を得た．

次に*B. fragilis* 1010の各培養時間における超音波処理菌について致死率を検討した．その結果は表2に示すごとく，TF medium (agarぬき) で12時間培養した後，超音波処理した菌の上清液をマウスの尾静脈に0.2 ml接種したところ，20匹中6匹が死亡し，致死率は30%であった．24時間培養後の超音波処理菌で

Table 1. Lethal toxicity and viable counts of the cultures of *B. fragilis* 1010 at different incubation periods

Incubation period (hr)	Number of dead mice/10 mice challenged[a] (Mortality %)	Viable cell count/ 0.2 ml culture
12	1 (10.0)	5.8×10^8
24	4 (40.0)	3.0×10^8
48	6 (60.0)	2.2×10^7
72	4 (40.0)	4.8×10^6
96	2 (20.0)	4.4×10^6
120	1 (10.0)	6.8×10^5

a) one fifth ml of culture was i.v. injected into mouse tail and Reading was performed 3 days after the challenge.

Table 2. The influence of different incubation period on the lethal toxicity of treated cell suspension[a]

Incubation period (hr)[b]	Number of dead mice /20 mice challenged (Mortality %)
12	6 (30.0)
24	9 (45.0)
48	10 (50.0)
72	8 (40.0)
96	6 (30.0)
120	7 (35.5)

a) Bacterial cells were harvested at different incubation periods and intermittently subjected to ultrasonic treatment at 145 w/20KHz for 1 min. The treatment was intermittently repeated for 20 times at an intervals of 30 sec.
b) The strain 1010 were cultured for different lengthes of time and centrifuged. The collected cells were submitted to ultrasonication. The treated cells were suspended in 30 ml of saline and 0.2 ml of the suspension was used for injection. Reading was performed 3 days after the challenge.

は，20匹中9匹（45.0%）となり，48時間培養後の菌体処理後の上清液では，さらに20匹中10匹（50%）となり，実験群中最高値を示した．また，72時間培養後では20匹中8匹(40%)と依然高い致死率を示した．しかし96,120時間培養後の菌体処理後の上清液では，各々30%，35%と大差はなく，12時間培養後の菌体のそれに近似した成績であった．

以上の実験結果から，*B. fragilis* 1010による致死現象は本菌の菌体内成分によるものであることが推定された．

3．超音波処理菌の粉末の静脈内接種による病原性

TF medium（但し agar ぬき）で24時間培養した *B. fragilis* 1010の菌体を超音波処理し，得られた超音波処理菌の粉末を各濃度に懸濁し，dose response を検討した．すなわち，各濃度溶液の0.2 ml をマウスの尾静脈内に接種した．その結果，表3に示すごとく，0.5 mg および1.0 mg 接種群は20匹中死亡したものはなく，2.5 mg 接種群は5%，5 mg 接種群は25%，7.5 mg 接種群は85%，10 mg 接種群は95%の致死率であった．接種量の増加に伴ない致死率も上昇した．この時 LD_{50} は5.35 mg であった．

接種後のマウスは運動性が低下し，食欲不振および毛が逆だって悪くなり，特に12時間以降では図1に示すごとく，すべてのマウスに片眼あるいは両眼に浸出

Table 3. Lethal toxicity of treated cell suspension[a] of B. fragilis 1010

Treated cells (mg)[b]	Number of dead mice /20 mice challenged[c] (Mortality %)
0.5	0 (−)
1.0	0 (−)
2.5	1 (5.0)
5.0	5 (25.0)
7.5	17 (85.0)
10.0	19 (95.0)

a) Refer to the Table 2.
b) A 0.2 ml volume of cell suspension in saline was i.v. injected.
c) Reading was performed 3 days after the challenge.

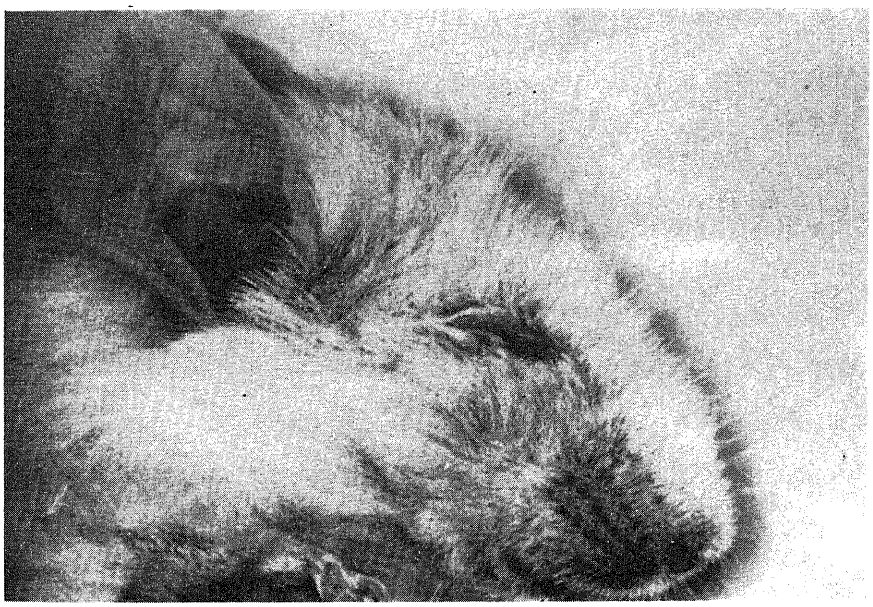

Fig. 1. The symptoms of secrete from eyes and closing of eyes in mice were observed 24 hr after an intravenous injection of treated cell suspension of *B. fragilis*. Eye is closed and secrete (black portion) is adherent on the lid.

液を伴った閉塞状態を呈した．また，図2に示すごとく，黒色の硬い糞便が肛門周辺に付着した症状をも呈した．しかし，生存したマウスは3日目より各症状が改善し，5日目には正常に回復した．

4．超音波処理菌の生物活性

先の実験で超音波処理菌によるマウスの死亡が高濃度で認められたため，超音波処理菌についてその生物活性を検討した．

1）ラット皮下接種による皮膚変化

ラットの背面の皮下接種による皮膚変化の生物活性を検討した．その結果は，表4に示すごとく，接種量の増加に伴ない硬結，瘢痕，発赤等の症状は増大し，最大症状発現日数は接種量の多少に関係なく接種後5日目であった．また，いずれの接種量でも肉眼的には潰瘍は認められなかった．図3はその所見であるが，Aは2.5 mg，Bは5.0 mg，Cは10.0 mg，Dは15.0 mg，Eは20.0 mgのものである．図4は病理組織所見であるが，接種域の皮下組織は浮き上がった状態を呈しており，その下層は化膿性炎症が強く，円形細胞浸潤が著しい．また，炎症は筋層まで達しており，肉芽形成が認められる．全体として境界は比較的明瞭である．

2）発熱性試験

超音波処理菌の最少発熱量を検討した．その結果は図5に示すごとく，50 mgでは最高体温は注射後4時

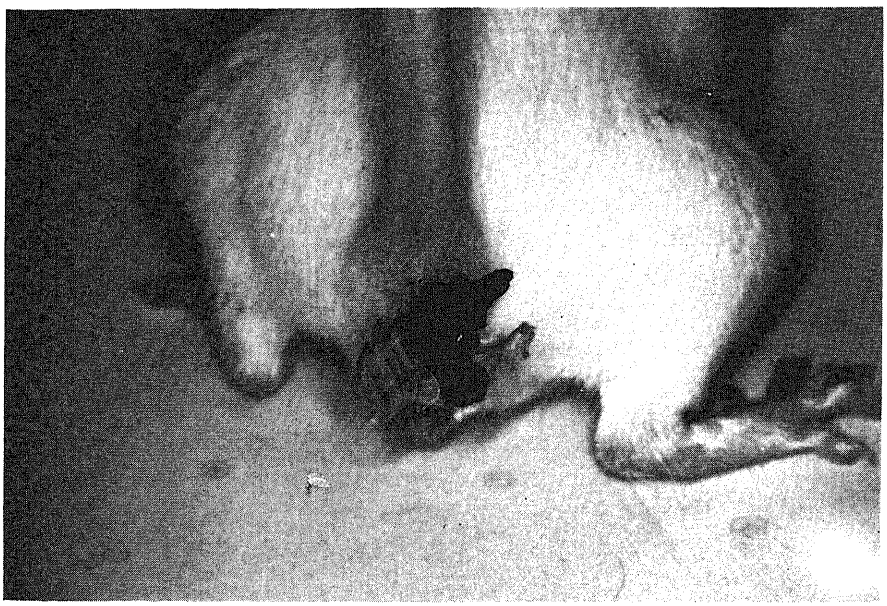

Fig. 2. Appearance of anus with dark stiff stool was observed after intravenous injection of *B. fragilis* 1010 treated cell suspension.

Table 4. Subcutaneous reactions in rats to treated cell suspension[a] of *B. fragilis* 1010

Treated cells (mg)[b]	Pathological findings[c]			
	Induration	scar	Redness	Ulcer
2.5	+[d]	+	+	−
5.0	+	+	+	−
10.0	++	++	++	−
15.0	+++	++	++	−
20.0	+++	+++	+++	−

a) Refer to the Table 2.
b) A 0.2 ml volume of cell suspension in saline was i.v. injected.
c) Reading was performed 14 days after the challenge on the back skin of rat.
d) −, Negative; +, less than 5×5 mm, ++, 5×5 to 10×10 mm; and +++, more than 10×10 mm.

間で現れ，6時間後には control に近づいている．最高上昇率は 50 mg で 1.2°C，25 mg で 1.1°C，12.5，6.2，3.1 mg ではいずれも 1°Cであり，1.5 mg のみが 0.3°Cと 0.6°C以下であったことから，最少発熱量は 3.1 mg を算出した．

3）Shwartzman 反応

i）単一皮内反応：まず超音波処理菌の単一皮内反応を検討した．家兎の腹部を剃毛し超音波処理菌の粉

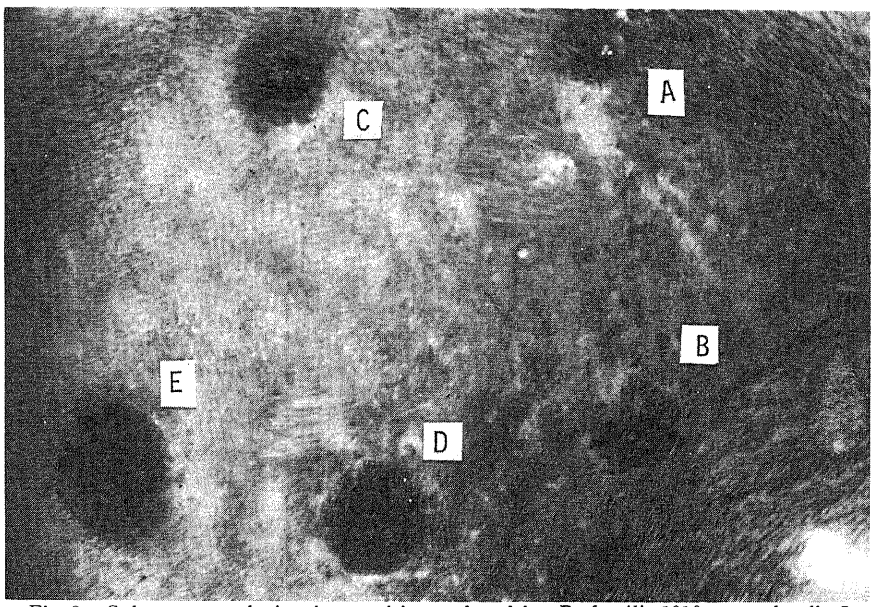

Fig. 3. Subcutaneous lesion in rat skin produced by *B. fragilis* 1010 treated cells 5 days after injection. Different doses of treated cell suspension were injected : A, 2.5mg ; B, 5.0mg ; C, 10.0mg ; D, 15.0mg ; E, 20.0mg.

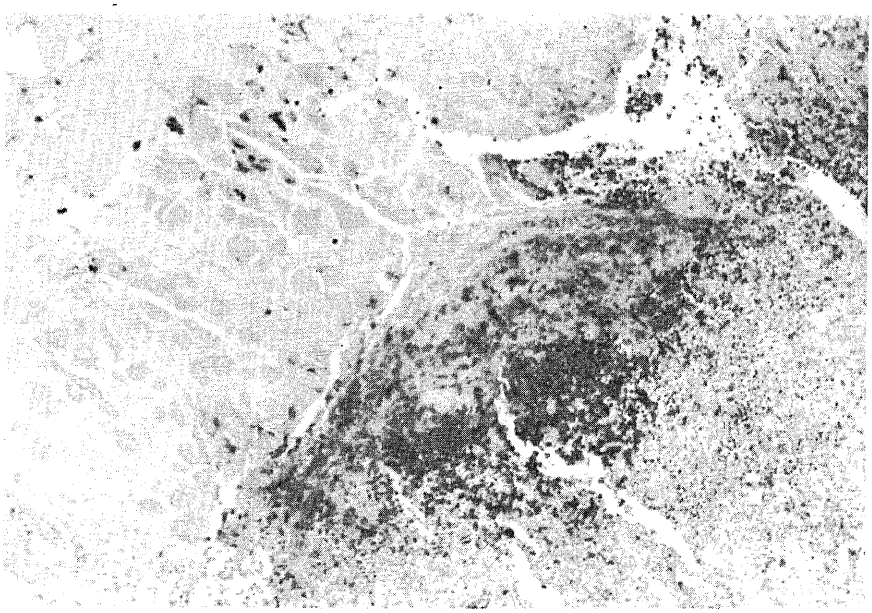

Fig. 4. Tissue section from the inflammatory lesion in rat produced by the subcutaneous injection of *B. fragilis* 1010 treated cell suspension. (Hematoxylin & Eosin ; ×40)

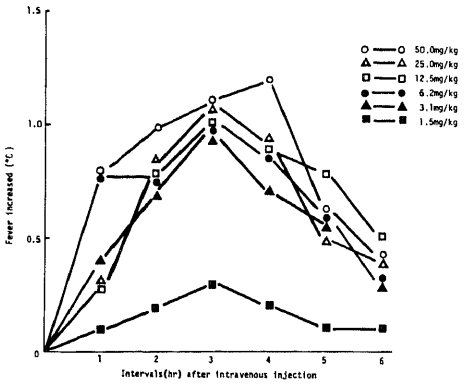

Fig. 5. Pyrogenic response of rabbits to *B. fragilis* strain 1010 ultrasonication-treated cells.

末を 0.2 ml 当り 2，4，8，16 mg に調整して皮内に接種し，経日的に皮膚の変化を観察した．接種後硬結と発赤と一部に痂皮を認め，中でも硬結が強く現れたので，硬結部の長径と短径を経日的に計測した．その結果は表 5 に示すごとく，最大症状発現日数は 16 mg が 4 日目であり，8 mg が 2 日目と早く，4 mg は 3 日目であった．症状の消退は 8 mg が 11 日目，4 mg が 10 日目であったが，16 mg は 28 日経過しても消退しなかった．2 mg は接種後 4 日目には消退した．また，control として接種した滅菌生食水は何ら反応を示さなかった．

ii）局所 Shwartzman 反応：超音波処理菌の粉末を 0.2 ml 当り 2，4，8，16 mg になるように調整して準備液とし皮内に接種し，24 時間後に惹起液として同様の処理菌の粉末を 16 mg/2 ml 耳縁静脈に接種して皮膚の変化を経日的に観察した．いずれの接種部位にも硬結と発赤と一部痂皮のみであり，出血壊死は認められなかった．すなわち，単一皮内接種と比較するとほとんど変化は認められず差はなかったが，16 mg 接種では硬結の症状は 25 日目には消退していた．また，2 mg 接種による皮膚の変化は認められなかった．

iii）*E. coli* の lipopolysaccharide（以下 LPS と略）による交差試験：*E. coli* 055：B 5（Difco, USA）の LPS 0.2 mg を惹起液とした交差試験を施行した．その結果は表 6 に示すごとく，2 mg 以外のいずれの準備液接種域にも，惹起液接種前には硬結と軽度の発赤のみであったものが，惹起接種後 6 時間で強い出血壊死を認めた．出血壊死部は 2 日目が最も強く現れ，漸次消退し 6 日目には完全に消失した．しかし，硬結は存続しており，最大症状発現日数は 16 mg と 4 mg が 5 日目，8 mg が 6 日目に見られ，本実験の超音波処理菌の惹起液接種による Shwartzman 反応と比較す

Table 5. Intracutaneous reactions in rabbits to treated cell suspension[a] of *B. fragilis* 1010

Treated cells (mg)[b]	Size of intracutaneous lesion at different days after the injection (X mm)											
	1/4	1	2	3	4	5	6	7	10	14	21	28 (days)
2	1.2×2.0	2.3×2.6	2.5×3.2	2.2×2.2	0 × 0							
4	3.3×3.4	6.2×6.2	6.2×6.5	6.6×7.4	6.1×6.4	4.9×5.5	4.3×4.4	4.2×4.9	0 × 0			
8	5.0×5.5	6.1×7.9	6.7×7.8	6.6×7.5	6.9×7.4	6.2×6.7	5.4×5.9	4.8×5.7	2.4×3.1	0 × 0		
16	6.8×7.0	7.6×7.9	7.5×7.9	8.6×8.6	8.8×9.3	8.4×9.2	7.9×8.7	7.2×8.2	8.1×8.9	7.1×8.9	7.2×7.2	5.1×5.4
Control	0 × 0											

a) Refer to the Table 2.
b) A 0.2 ml volume of cell suspension in saline was i.v. injected.

Table 6. Shwartzman cross reaction to *E. coli* endotoxin in the rabbits pretreated by treated cell suspension[a] of *B. fragilis* 1010

Treated cells (mg)[b]	Size of hemorrhagic necrosis which appeared at different days after the provoking injection (x mm)											
	1/4	1	2	3	4	5	6	7	10	14	21	28 (days)
2	0 × 0											
4	3.6×3.8	3.6×4.0	3.4×4.7	4.2×4.8	5.5×5.8	4.5×5.1	4.5×5.1	3.9×5.1	5.2×5.3	4.1×4.2	2.2×3.2	2.5×3.1
8	4.4×5.8	4.7×5.0	4.3×4.8	5.2×5.8	6.2×6.2	7.4×8.1	7.7×8.1	6.7×7.6	6.2×6.4	5.1×5.3	4.1×4.2	4.3×4.9
16	5.5×6.2	7.2×7.4	7.6×8.6	7.6×8.7	9.3×9.8	11.4×11.5	10.5×10.9	10.3×10.9	9.4×9.5	10.5×10.6	95 ×10.4	8.7×8.7
Control	0 × 0											

a) Refer to the Table 2.
b) A 0.2 ml volume of cell suspension in saline was i.v. injected.

ると反応は非常に増強されている．図6は交差試験の際に生じた16 mg皮内接種部位の所見で，図7はその病理組織像である．表皮直下に強い出血と好中球の浸潤および浮腫を認め，一部表皮まで達しており，深層は壊死を認めるなど典型的なShwartzman反応の所見であった．

5．*Bacteroides* の分離株および分与菌株の超音波処理菌における Shwartzman 反応

分離菌株12株，分与菌株9株の計21株の *Bacteroides* species全般に亘る局所Shwartzman反応交差試験について検索した．各菌株の超音波処理菌の粉末を作製し，その0.2 ml当り4，8，16 mgになるように調整し準備液として，家兎の腹部皮内に接種した．24時間後に惹起液として，*E. coli* 055：B 5のLPSを0.2mg/2 ml耳縁静脈に接種後，皮膚の変化を5日目に判定した．その結果は，16 mg接種群は，表7に示すごとく，出血壊死部をノギスにて計測したが，分離菌株に出血壊死の著しい，周囲に発赤を伴なったShwartzman反応陽性の菌株が認められた．中でも，分離菌株 *B. fragilis* KI-14は43.0×44.0 mmと極めて著しい出血壊死を示した．しかし，この菌株の由来には特記すべき所見はなく，口腔内の歯石から分離した菌株であった．

一方分与された菌株は，出血壊死は小さく，発赤も弱く，Shwartzman反応は弱陽性の菌株が多かった．なお，4および8 mg/0.2 mlの接種部位には反応は現れず，再度の実験でも反応は現れなかった．

検索した菌株 *Bacteroides* speciesは5種21株であったが，菌種間にはShwartzman反応陽性に強弱反応はなく，*Bacteroides* speciesには一様にShwartzman反応が認められた．

考　　按

口腔領域の感染症のうち，嫌気性菌で病原性が判明しているのは放線菌症のみであるが，ほとんどの感染症に嫌気性菌が関与していることは疑いのない事実である[11]．当教室では従来より，感染症の炎症巣より採取した材料から嫌気性菌の分離をおこない，696検体中335検体・52.5%の嫌気性菌と好気性菌の混合感染を認め，口腔領域の疾患には半数以上の症例に嫌気性菌が関与していることを報告している[12]．また，口腔内感染症に嫌気性菌の単独症例が25.4%と嫌気性菌が高率に関与していることも報告し[12]，これら分離された嫌気性菌はほとんどが常在菌であり，口腔内感染症がendogenous infectionであることを示唆している．このように，弱毒菌または非病原菌とされる嫌気性菌によるopportunistic infectionが近年多数認められて

きたことについて，ACTH・副腎皮質ホルモン・抗腫瘍剤・各種抗生物質あるいは放射線照射等による治療法の発達に伴ない，その多用が常在菌叢に乱れをきたすためか，あるいは感染症に対する抵抗力の低下を誘起してくるためであり，宿主側の要因が大きく関与しているとされている[13]．一方，微生物側の病原性因子についても数多くの研究がなされている．特に *Bacteroides* は，宿主側の要因だけでなく菌側の要因も重要で

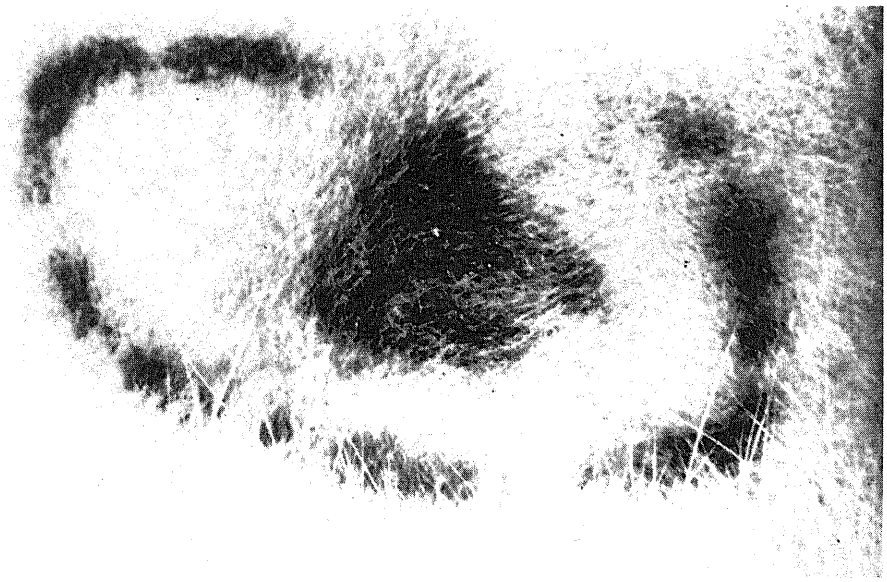

Fig. 6. Shwartzman reaction in rabbit skin produced by the preparatory injection of *B. fragilis* strain 1010 treated cell suspension and provoking intravenous injection of E. coli endotoxin. Area of haemorrhagic necrosis shown in photograph developed 2 days after provocative intravenous injection.

Fig. 7. Tissue section from the resection shown in Fig. 6. Massive neutrophil leukocytic infiltration and engorgement of blood vessels under the epidermis are observed. 'Hematoxylin & Eosin ; ×40)

Table 7. Shwartzman cross reaction to *E. coli* endotoxin in the rabbits pretreated by treated cell suspension[a] of isolates and a stock strain

Teated cells (mg)[b]		Size of haemorrhagic necrosis which appeared at 5 days atfer the provoking injection (×mm)
B. fragilis	KT-32	26.0×19.0
	KT-33	18.0×12.0
	KT-34	9.0× 3.0
	KI-3	14.2×13.2
	KI-5	5.0× 3.0
	KI-11	34.0×24.0
	KI-14	44.0×43.0
	KI-22	5.4× 5.1
	KI-23	29.0×26.0
	SI	14.0×10.0
	T-28	6.0× 4.0
	7000	15.6×10.0
	7001	4.3× 3.5
	7002	6.4× 6.2
	7004	15.3×12.0
	7008	16.0×11.0
B. thetaiotaomicron	7005	9.0× 6.0
	7006	14.0×12.8
B. melaninogenicus	KK-1	12.0×12.0
B. distasonis	7007	5.0× 4.0
B. oralis	7010	17.0×15.0

a) Refer to the Table 2.
b) A 0.2 ml volume of cell suspension in saline was i.c. injected.

あり，opportunistic infection の解明にはこの両面から病態を検討されてきたが，*Bacteroides* のもつ病原性を解明することは弱毒菌や非病原菌であるだけに困難な点が多い．ただ *Bacteroides* は，弱毒菌でありながら，しばしば重篤な症状を惹起するので注目されてきた[14)~19)]．中でも *B. fragilis* は強い β-lactamase を産出し，β-lactam 系抗生物質には全く無効であり，術後感染に多く関与し，しかも，重篤な症状を呈している現状である[20)~22)]．Dupons ら[23)]，Bodner ら[24)]，Gelb ら[25)]，Marcoux ら[26)]は *Bacteroides* bacteremia で死亡した患者が高率であったことを報告している．さらに Felner ら[27)]は 250 名の bacteremia のうち，140 名は *B. fragilis* によるものであり，その死亡率は約 34%，Chow ら[28)]は63%，Mackenzie ら[29)]は 42.1% と *Bacteroides* による死亡率の高いことを報告している．このように *Bacteroides* は弱毒菌であるが，宿主側の状況によって容易に，terminal infection となり得る病原性を有しており，この菌のもつ opportunistic pathogenicity を解明することは重要である．

近年，opportunistic pathogenicity の解明に非常な努力が払われているが，その病原性の本態解明が十分とはいえない．Quinto[30)]は *Bacteroides* と *Fusobacterium* の培養液をマウス・家兎・モルモットの鼠径部に筋注し，その病原性を証明し報告している．さらに，Walker ら[31)]の *B. fragilis* 25 株の培養液を 0.5 ml（2×10^9cells）マウスの鼠径部に各群 10 匹づつ皮下接種し，25 株中 21 株に 1 匹以上の膿瘍形成を認め，そのうち 13 株は 50%以上に膿瘍を認めたとする報告など若干の論文がある．また，渡辺[32)]の *B. fragilis* を用いた実験的感染症によれば，マウスの尾静脈に 10^9個接種し 24 時間以内に 5 匹中 4 匹（80%）が死亡したことを報告している．また，この死亡したマウスの脳・肺・心臓・肝・脾・腎の各臓器から，*Bacteroides* が回収されており，10^8個接種ではマウスの毛が逆だち容態が悪くなるが，次第に回復して死亡することは皆無であったことなども述べている．

このような観点から著者は，*B. fragilis* の培養液接種による病原性について *in vivo*, *in vitro* の実験感染症を試みた．各培養時間の培養液中に含まれる生菌数と致死率ではいくらか異なり，最も高い致死率(60%)

は48時間培養であったが，生菌数は12時間培養の5.8×10^8/mlに対し，48時間培養の生菌数は2.2×10^7/mlにすぎなかった．すなわち，*B. fragilis*は，病原性としては48時間培養液が最も強く，また致死現象をみると必ずしも生菌数と比例しておらず，したがって何らかの菌体成分が関与していることが推察された．この毒性について既に渡辺は115°C，15分で耐性であると述べている．

著者も耐熱性の実験を試みた．*B. fragilis* 1010の培養液を7.8×10^7cells接種して10匹中7匹(70%)の致死率を得たものをさらに，115°C・15分加熱処理したあと接種しても，なお10匹中5匹(50%)が死亡し，この毒性が熱に安定であることを確認した．毒素が耐熱性であることから，endotoxinのような菌体内成分によるものでないかと考えた．そのため，直接菌体を破壊し，超音波処理菌を凍結乾燥によって粉末とし，この粉末を生食水に懸濁しマウスに接種した．その結果，10 mgで95%，7.5 mgで85%の致死率を認めたことから，極めて弱いながらも毒性が存在することが判った．また，注射したマウスは両眼あるいは片眼の閉塞状態および黒色糞便が硬く付着している状態を認めた．endotoxinと眼症状については，Levene[33]が家兎で，またOllodertら[34]がヒトで眼とendotoxinの関係について述べている．以上のことから，超音波処理菌の接種による致死現象はendotoxinによる作用と似た現象であると考えられる．またラットの背面に皮下接種し，化膿性炎症を認めたことから炎症性産物を有する物質が含有されていると考えられる．一般にendotoxinは使用する実験動物により感受性が異なり，Berczi ら[35]は*E. coli* 078株のLPSによる致死作用に対する感受性を比較し，体重18±4 gのマウスのlethal doseは25〜60 mg/kgであり，体重300±50 gのラットは20〜60 mg/kg，体重3±1 kgの家兎は3 mg/kgであり，かなりの差のあることを報告している．Galanos[36]も*Salmonella*のLPSを用いた実験において，マウスのLD_{50}は300〜1750 mcgと報告している．さらに福士[37]も*E. coli* 0113株から抽出したendotoxinによるLD_{50}は0.35 mgと述べているが，Watson ら[38]は家兎におけるLPSの感受性に関し，発熱反応，致死現象および皮膚反応のいずれにおいても幼若な家兎の方が感受性が低かったことから，動物のもつ免疫機構を重視している．しかし本実験ではLD_{50}は5.35 mgで，福士[37]の*E. coli*のLD_{50}の約15倍もあり，単に動物間の差だけでなく本実験に使用した超音波処理菌は粗製物質のためと考えられる．

endotoxinの特性の1つに耐熱性があり，Kanoh ら[39]は*E. coli*から抽出した*pyrogen*に対し熱失活を試み，120°C・30分間の加熱では失活せず，180°C・90分間または250°C・30分間で完全に失活したと報告している．本実験では60°C・20分間で蛋白質凝固を呈し，冷却遠心して得られた上清液には致死活性は認められなかったが，これは超音波処理菌の致死活性がprotein部分に存在するか，もしくは除蛋白によるendotoxinの不活化[40]ではないかと考える．

endotoxinは細菌性発熱物質としては最も強力なものであり，かなり微量でも発熱反応を認めるため，その物質の活性の強弱をみるためには最少発熱量を測定することが推奨されている．Mergenhagen[41]は家兎に1 mcgを静注して3時間後に上昇した直腸温を測定し，*V. alcalescens*が3°Cと最も高く，続いて*F. polymorphum* 2.5°C，*B. melaninogenicus* 1.5°Cで，*B. melaninogenicus*の活性が低いことを指摘している．本実験では最少発熱量は3.1 mg/kgとかなり多く，*Salmonella*のLPSの0.007〜0.004 mcg/kg[36]や，*B. melaninogenicus* 25〜100 mcg/kg[42]と比較しても極めて感受性が低いことが判明した．しかし，内容的にはLPSの示す発熱性を有することからLPSに近似する物質が含有されていることが判った．

以上述べてきた超音波処理菌はendotoxinとの関係が推察されたが，この毒素の重要な生理作用の1つとしてShwartzman反応があるので，以下これについて述べる．すなわち，BØeが*Fusobacterium*と*Leptotrichia*を自己隔解させた培養濾液を用いて家兎にShwartzman反応を惹起せしめた[43]．その後，Mergenhagen ら[43][44]が*Veillonella*と*Fusiform bacilli*の培養液をtrypsin処理したendotoxin productを用いて家兎にShwartzman反応を生じさせ，さらに*B. melaninogenicus, F. nucleatum*などからphenol-water法によって抽出したendotoxinを用いて家兎にShwartzman反応を生じさせた．この他，Rizzo[45]は*Veillonella*を用い，Jensen[46]も*F. polymorphum*を用いてShwartzman反応を生じせしめた．特にMergenhagen[41]はグラム陰性菌のShwartzman反応の最少有効準備液量を検討し，*V. alcalescens* 1.0 mcg，*F. polymorphum* 25 mcg，*B. melaninogenicus* 100 mcgと差のあることを示し，ここでも*B. malaninogenicus*の活性の低いことを報告している．本実験の超音波処理菌によるShwartzman反応では準備液を2，4，8，16 mgの0.2 ml生食水懸濁液を皮内接種し，惹起液16 mgを耳縁静脈に接種したが，Shwartzman反応は認められず，単一皮内接種と比較してもほとんど変化は認められなかった．この際，生じた硬結は持続的で長期間存在していることから，Shwartzman反応の出血壊死とは関係なく，超音波処

理菌液の中に超因物質が含まれると考えられる．Schwab ら[47]は既にA群 *Streptococcus* の菌体抽出物の皮内接種にみられる硬結形成成分による硬結の記載をしているが，これと同一現象と考えられる．惹起液に超音波処理菌を使用した Shwartzman 反応は認められなかったが，*E. coli* の LPS による交差試験では明らかに Shwartzman 反応が確認された．すなわち，惹起液接種後6時間で準備液4，8，16 mg の懸濁液に出血壊死が出現したが，6日目では消失した．しかし硬結は5日目が最も強く，単一皮内接種や同種 Shwartzman 反応に比べて硬結の経過は長く続いた．このように超音波処理菌の粉末の最少有効準備液量は4 mg と考えられるが，Mergenhagen の *B. melaninogenicus* のそれと比較して約40倍の量である．

以上のごとく，各実験群において使用した超音波処理菌の粉末の量は他の報告者のグラム陰性菌の endotoxin の量と比較して多いが，これは本実験では，超音波処理のみを施しているので *B. fragilis* の endotoxin 採取法としては，素毒素を使用していることに原因がある．しかも嫌気性菌では，Hofstad ら[48]のおこなった phenol-water 法および EDTA，trichloro-acetic acid の三者の方法で抽出した *B. fragilis, B. melaninogenicus, B. oralis* の各 LPS の活性がいずれも低いとする報告があり，Sveen ら[49][50]や Hofstad[51]の *Salmonella* の LPS よりかなり毒素が低いと報告にあるように，一般に *B. fragilis* の生物活性は低い[52]ことが考えられる．従って，*B. fragilis* の LPS と他のグラム陰性桿菌の LPS との根本的相違[53]や莢膜の有無による LPS の活性の相違[54]を指摘する報告もあり，*Bacteroides* species の分離菌株・22株についても施行した．しかし，Hofstad ら[48]の報告を確認する結果で，いずれの species においても Shwartzman 反応弱陽性で，活性の低いことが判った．

結　　論

Bacteroides species の病原性に関して実験をおこない，次の結論を得た．

1）*B. fragilis* 1010 の各時間の培養液をマウスに接種し，培養液中の生菌数と致死率との関係を調べた．最も高い毒性は，48時間培養であった（60%致死率）が，この際生菌数は12時間培養の 3.0×10^8/ml に比べて 2.2×10^7/ml と減少した．しかし，48時間よりさらに培養すると生菌数も毒性も減少した．

2）48時間培養後，超音波処理し遠心後得られた上清液中の致死率は50%，また24時間および72時間培養後のそれは45%および40%の致死率がえられた．12時間，96時間および120時間培養後の超音波処理菌の粉末では致死率は30%前後であった．

3）超音波処理し凍結乾燥して得られた粉末をマウスに接種したところ，10 mg で95%，7.5 mg で85%，5.0 mg で25%，2.5 mg で5%の致死率を得，この時の LD_{50} は5.35 mg であった．この際，両眼あるいは片眼の閉塞状態および黒色糞便の付着状態が観察された．

4）超音波処理菌の粉末をラットの背面に皮下接種したところ，2.5，5，10，15，20 mg のいずれの接種部位にも硬結・瘢痕・発赤などの炎症所見を認め，その最大症状発現日数は接種量に関係なく5日目であった．

5）超音波処理菌の粉末の発熱反応を家兎を用いて施行したところ，最少発熱量は3.1 mg/kg であった．

6）超音波処理菌の粉末の16・8・4・2 mg を準備液とし，その16 mg を惹起液とした Shwartzman 反応を試みたところ，出血壊死は認められなかった．しかし，16・8・4 mg の接種域に強い硬結を認め，これは単一皮内接種の症状とほとんど変化はなかった．

7）口腔内から分離・同定した菌株および分与菌株の *Bacteroides* すべてに局所 Shwartzman 反応交差試験陽性であった．

8）以上の事実，すなわち，*Bacteroides* の毒性が菌体内に存在し，弱いながらも致死作用をもち，且つ pyrogenicity，Shwartzman 反応を併せもち，耐熱性であるという事実から，endotoxin との相似性について討論をおこなった．

謝　　辞

稿を終るに臨み，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わりました恩師玉井健三教授に衷心より深甚なる謝意を捧げると共に，御懇篤なる御校閲を賜わりました西田尚紀教授に対し，衷心より感謝の意を表します．また，御助言を戴きました竹松啓一講師をはじめ，本研究に御協力戴いた歯科口腔外科学教室の諸先生方に感謝いたします．

なお，本論文の要旨は第33回日本口腔科学会総会（1977年），第23回日本口腔科学会中部地方会（1978年），および第27回日本口腔外科学会総会（1982年）において発表した．

また，本研究の一部は文部省科学研究費（課題番号，一般研究（C）057119）によった．記して謝意を表します．

文　　献

1）宮　悌伍：顎口腔領域における歯性化膿の細菌学的研究．口科誌，**9**, 214-231 (1958).

2）小酒井　望・鈴木祥一郎：嫌気性菌と嫌気性菌症．第1版，272-306頁，医学書院，東京．1968.

3）**Klainer, A. S. & Beisel, W. R.**: Opportunistic infection: a review. Am. J. Med. Sci., **258**, 431-456 (1969).

4) **Smith, H.**: Opportunistic infection. Br. Med J., **14**, 107-110 (1973).

5) **Feigin, R. D. & Shearer, W. T.**: Opportunistic infection in children l. In the compromised host. J. Pediatr., **87**, 507-514 (1975).

6) **Graevenitz, A.**: The role of Opportunistic bacteria in human disease. Ann. Rev. Microbiol., **31**, 447-471 (1977).

7) **Gorbach, S. L. & Bartlett, J. G.**: Anaerobic infections. N. Engl. J. Med.,**290**, 1177-1184, 1237-1245, 1289-1294 (1974).

8) **玉井健三・福田順子**：口腔内嫌気性菌の研究．第1報，分離培地の検討．口科誌，**19**, 495-504 (1970).

9) **伝染病研究会学友会編**：細菌学実習提要，第5版，164-166頁，丸善KK，東京．1958.

10) **日本公定書協会編**：日本薬局方，第1部解説書（第8改定），第1版，B-160-166頁，広川書店，東京．1971.

11) **小酒井　望・鈴木祥一郎**：嫌気性菌と嫌気性菌症，第1版，224-231頁，医学書院，東京．1968.

12) **玉井健三**：口腔内嫌気性菌の研究．口科誌，**27**, 393-415 (1978).

13) **上野一恵**：常在菌としての嫌気性菌と病原菌としてのきめて．日細誌，**22**, 347-348 (1967).

14) **Ernst, O.**: Zur Bedeutung des Bac. funduliformis als infections-Erreger. Zeitschr. f. Hygiene., **132**, 352-359 (1951).

15) **Quayle, A. A.**: Bacteroides infections in oral surgery. J. Oral Surg., **32**, 91-99 (1974).

16) **Gross, B. D., Roark, D. T., Meador, R. C. & Cohen, A. M.**: Ludwig's angina due to bacteroides. J. Oral Surg., **34**, 456-460 (1976).

17) **Roser, S. M., Chow, A. W. & Brady, F. A.**: Necrotizing fasciitis. J. Oral Surg., **35**, 730-732 (1977).

18) **Goupil, M. T., Steed, D. L. & Kolodny, S. C.**: Hyperbaric oxygen in the adjunctive treatment of chronic osteomyelitis of the mandible: report of case. J. Oral Surg., **36**, 138-140 (1978).

19) **Geiseler, P. J., Wheat, P., Williams, R. A. & Glineberg, R.**: Isolation of anaerobes in Ludwig angina. J. Oral Surg., **37**, 60-63 (1979).

20) **柴田清人・桑原章吾・真下啓明・後藤幸夫・藤井良知・石山俊次・青河寛次・石神襄次・高須照男**：シンポジウム：グラム陰性桿菌感染症．第17回日本医学会学術記録集II，139-187頁，(1967).

21) **Finegold, S. M. & Rosenblatt, J. E.**: Practical aspects of anaerobic sepsis. Medicine, **52**, 311-322 (1973).

22) **三輪谷俊夫・中村　功・坂田育弘・松田静治・古田　格**：シンポジウム：無芽胞嫌気性菌の感染症．臨床病理，**25**, 695-719 (1977).

23) **Dupont, H. L. & Spink, W. W.**: Infections due to Gram-negative organisms: an analysis of 860 patients with bacteremia at the University of Minnesota Medical Center, 1958-1966. Medicine, **48**, 307-332 (1969).

24) **Bodner, S. J., Koenig, M. G. & Goodman, J. S.**: Bacteremic *bacteroides* infections. Ann. Intern. Med., **73**, 537-544 (1970).

25) **Gelb, A. F. & Seligman, S.J.**: *Bacteroidaceae* bacteremia. Effect of age and focus of infection upon clinical course. J. A. M. A., **212**, 1038-1041 (1970).

26) **Marcoux, J. A., Zabransky, R. J. Washington II, J. A., Wellman, W. E. & Martin, W. J.**: *Bacteroides* bacteremia. Minn. Med.,**53**, 1169-1176 (1970).

27) **Felner, J. M. & Dowell, V. R.**: "*Bacteroides*" bacteremia. Am. J. Med., **50**, 787-796 (1971).

28) **Chow, A. W. & Guze, L. B.**: *Bacteroidaceae* bacteremia: clnical experience with 112 patients. Medicine, **53**, 93-126 (1974).

29) **Mackenzie, I. & Litton, A.**: *Bacteroides*-bacteremia in surgical patients. Br. J. Surg., **61**, 288-290 (1974).

30) **Quinto, G.**: Identification of non-sporulating anaerobes. Am. J. Med. Technol., **30**, 304-312 (1964).

31) **Walker, C. B. & Wilkins, T. D.**: Use of semisolid agar for initiation of pure *Bacteroides fragilis* infection in mice. Infect. Immun., **14**, 721-725 (1976).

32) **渡辺邦友**：臨床病理領域から見た感染症の変貌（3），嫌気性菌感染症．臨床病理，**25**, 273-276 (1977).

33) **Levene, R.**: General and ocular effects of endotoxin. Surg. Ophthalmol., **4**, 581-592 (1959).

34) **Ollodart, R. M., Hawthorne, I. & Attar, S.**: Studies in experimental endotoxemia in man. Am. J. Surg., **113**, 599-607 (1967).

35) **Berczi, I., Bert'ok, L. & Bereznai, T.**: Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lippolysaccharide endotoxin in various animal species. Can. J. Microbiol., **12**, 1060-1071 (1966).

36) **Galanos, C.**: Physical state and biological

activity of lipopolysaccharide. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component. Z. Immun-Forsch., **149**, 214-229 (1975).

37) **福士主計**：細菌内毒素の局在．第17回日本医学会総会学術講演集．II，35-39 (1967).

38) **Watson, D. W. & Kim, Y. B.**: Modification of host resposes to bacterial endotoxins. I. Specificity of pyrogenic tolerance and the role of hypersensitivity in pyrogenicity, lethality, and skin reactivity. J. Exp. Med.,**118**, 425-446 (1963).

39) **Kanoh, S., Mochida, K. & Ogawa, Y.**: Studies on heat-inactivation of pyrogen from *Escherichia coli*. Biken. J., **13**, 233-239 (1970).

40) **Kim, Y. B. & Watson, D. W.**: Inactivation of Gram-negative bacterial endotoxins by papain. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **115**, 140-142 (1964).

41) **Mergenhagen, S. E.**: Nature and significance of somatic antigens of oral bacteria. J. Dent. Res.,**46**, 46-52 (1967).

42) **Weiss, C.**: The Pathogenicity of *Bacteroides melaninogenicus* and its importance in surgical infections. Surg.,**1**, 683-691 (1942).

43) **Mergenhagen, S. E., Hampp, E. G. & Scherp, H. W.**: preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. J. Infect. Dis., **108**, 304-310 (1961).

44) **Mergenhagen, S. E.**: Endotoxic properties of oral bacteria as revealed by the local Shwartzman reaction. J. Dent. Res.,**39**, 267-272 (1960).

45) **Rizzo, A.A. & Mergenhagen, S. E.**: Local Shwartzman reaction in rabbit oral mucosa with endotoxin from oral bacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,**104**, 579-582 (1960).

46) **Jensen, S. B. & Mergenhagen, S. E.**: Influence of endotoxin on the dermal response of rabbits to Human oral bacteria. Arch. Oral. Biol., **9**, 241-254 (1964).

47) **Schwab, J. H. & Cromartie, W. J.**: Studies on a toxic cellular component of group A *Streptococci*. J. Bacteriol., **74**, 673-679 (1957).

48) **Hofstad, T., Sveen, K. & Dahlen, G.**: Chemical composition, serological reactivity and endotoxicity of lipopolysaccharides extracted in different ways from *Bacteroides fragilis, Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides oralis*. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., **85**, 262-270 (1977).

49) **Sveen, K., Hofstad, T. & Milner, K. C.**: Lethality for mice and chick embryos, pyrogenicity in rabbits and ability to gelate lysate from amoebocytes of limulus polyphemus by lipopolysaccharides from *Bacteroides, Fusobacterium* and *Veillonella. Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **85**, 388-396 (1977).

50) **Sveen, K.**: The capacity of lipopolysaccharides from *Bacteroides, Fusobacterium* and *Veillonella*. to produce skin inflammation and the local and generalized Shwartzman reaction in rabbits. J. Periodont. Res., **12**, 340-350 (1977).

51) **Hofstad, T.**: Biological activities of endotoxin from *Bacteroides melaninogenicus*. Arch. Oral Biol., **15**, 343-348 (1970).

52) **Hofstad, T. & Kristoffersen, T.**: Chemical characteristics of endotoxin from *Bacteroides fragilis* NCTC 9343. J. Gen. Microbiol., **61**, 15-19 (1970).

53) **Kasper, D. L.**: Chemial and biological characterization of the lipopolysaccharide of *Bacteroides fragilis* subspecies *fragilis*. J. Infect. Dis., **134**, 59-66 (1976).

54) **Onderdonk, A. B., Kasper, D. L., Mansheim, B. J., Louie, T. J. Gorbach, S. L. & Bartlett, J. G.**: Experimental animal models for anadrobic infections. Rev. Infect. Des., **1**, 291-301 (1979).

Studies on the Pathogenicity of *Bacteroides*

Hirokazu Miyamoto, Department of Dento-Oral Surgery (Director: Prof. K. Tamai), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920

– J. Juzen Med. Soc., **92**, 674–688 (1983)

Abstract

The pathogenicity of *Bacteroides* in the human oral cavity, was examined with mice, rabbits and rats. The first series of basic experiments was carried out with the standard strain of *Bacteroides fragilis* 1010. A 0.2-ml volume of 48 hr culture in TF medium was intravenously injected

into the mouse tail. This dose of the culture was lethal to 6 of the 10 mice injected. The toxicity was not inactivated by heating at 115°C for 15 min. The lethal toxicity was further investigated since the pathogenicity of *Bacteroides* in its single infection still remains to be elucidated so far. The culture was then centrifuged at 1.300×G for 20 min at 4°C, and separated into the supernatant and sediment fractions. The supernatant did not exhibit any lethal toxicity to mice. However, the sediment cell fraction, when subjected to ultrasonic treatment, showed lethal and pyrogenic toxicities; the saline suspension of the treated cells, when i.v. injected, exhibited the LD_{50} of 5.35 mg and the minimum concentration for pyrexia of 3.1 mg/Kg. Also, the suspension was examined for the Shwartzman activity. The suspension was subcutaneously injected into the back skin of rats at the concentration of 2, 4, 8, and 16 mg/0.2 ml as the provocative dose. The Shwartzman reaction was negative in all the animals examined. The Shwartzman reaction, however, was positive when 0.2 mg of *E. coli*-LPS was used as the provocative injection instead of the treated cell suspension mentioned above.

The Shwartzman activity was further examined of 12 strains belonging to 2 different *Bacteroides* species isolated from oral cavity and 9 stock strains of different *Bacteroides* species; the latter includes *B. fragilis, B. thetaiotaomicron, B. melaninogenicus, B. distasonis* and *B. oralis.* All the strains examined exhibited positive reactions. Therefore, the pathogenicity of the *Bacteroides* species appears to be due to a substance similar to endotoxin.