

ディスク法による *Mycoplasma* の薬剤感受性の測定

高野 暁・北見 治・宮村 定男

新潟大学医学部細菌学教室

(昭和 43 年 11 月 9 日受付)

最近 *Mycoplasma* に対する関心が高まり、各方面で各種疾患について検索がなされている¹⁻⁸⁾。私共の教室でも、ヒトの口腔、気道分泌物および婦人生殖器からの *Mycoplasma* 分離について検討し、既に 100 株近い菌株を得て、その同定を行ないつつある。同時に化学療法剤に対する感受性を測定しているが、*Mycoplasma* の薬剤感受性についての研究は、未だ充分とはいえず、かつその多くは稀釈法によっている⁹⁻¹⁵⁾。しかも本菌は、他の細菌と異なり発育にかなりの時間を要するので、その結果は数日後になつて判明する。私共は、今回寒天平板拡散法による薬剤感受性測定について、とくにディスク法の応用を試み、かつ、宮村らが最初 Penicillin 迅速検定法として考案し、発展させた還元色素で処置する方法¹⁶⁻¹⁹⁾を用いることにより、1 日で判定することを実験したので報告する。

実験方法

供試菌株：今回は、主として私共が、婦人生殖器から分離した *Mycoplasma* 13 株を供試し、対照として慶応大学医学部微生物学教室および東芝生物化学研究所から分与を受けた *Mycoplasma laidlawii*, *Mycoplasma campo* および *Mycoplasma hominis* I 型および II 型を用いた。

供試寒天培地：PPLO 寒天 (Difco) 15 g soy broth 粉末 (B. B. L. 製品) 12.5 g, 酵母エキス 2.5 g, 蒸留水 500 ml の処方培地を用い、pH 7.8 に修正したのち、120°C 15 分滅菌し、中試験管に 10 ml および 4 ml ずつ分注し、前者を基層用、後者を種層用とした。

寒天平板作製：上記寒天培地 4 ml を加温溶解し、50°C に保つて、ヒト血清 1 ml および所定の菌量 (1 × 10¹⁰個/ml と定めた。これは血清加 soy peptone broth 48 時間培養したもの) を加え、上記の寒天培地 10 ml で作った寒天平板の上に重層する。

培養：寒天平板上に抗生物質検定用のカップあるいは薬剤を含ませた

ディスクを置き、冷室に約 1 時間放置したのち、37°C に培養する。

薬剤感受性の測定：24 時間後カップあるいはディスクをとり除いた後、0.05% 2,6-dichlorophenolindophenol 液を、寒天平板上に静かに注ぎ (カップ法にては、再蒸留水で 2 度静かに洗つてから)、5 秒ほどで残液を流出させ、再び 37°C 下に置き、30~60 分で阻止円を現出させ、その直径を測定する。

供試薬剤：Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracycline, Erythromycin, Kanamycin, Cephaloridine, Lincomycin, Sulfisoxazole および Nalidixic acid の 10 種の抗菌性物質について実験した。カップ法では所定の pH の 1% 燐酸緩衝液で稀釈液

表 1 *Mycoplasma laidlawii* および *Mycoplasma campo* の Erythromycin および Tetracycline に対する感受性 (カップ法)

Antibiotic	Concentration (ug/ml)	阻止円直径 (mm)	
		<i>M. laidlawii</i>	<i>M. campo</i>
Erythromycin	50	30.0	36.6
	5	24.0	28.0
Tetracycline	50	22.0	28.0
	5	11.0	12.0

表 2 *M. laidlawii*, *M. campo* および *M. hominis* の各種抗菌性物質に対する感受性 (ディスク法)

Antibiotic	Concentration	阻止円直径 (mm)			
		<i>M. laidlawii</i>	<i>M. campo</i>	<i>M. hominis</i> I	<i>M. hominis</i> II
Penicillin	20 u	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)
Streptomycin	50 μg	34.0 (卅)	32.0 (卅)	28.0 (卅)	20.0 (卅)
Chloramphenicol	100 "	40.0 (卅)	32.0 (卅)	30.0 (卅)	32.0 (卅)
Tetracycline	200 "	42.0 (卅)	34.0 (卅)	36.0 (卅)	32.0 (卅)
Erythromycin	50 "	42.0 (卅)	36.0 (卅)	42.0 (卅)	40.0 (卅)
Kanamycin	50 "	24.0 (卅)	12.0 (+)	18.0 (卅)	14.0 (+)
Cephaloridine	30 "	— (—)	— (—)	15.5 (+)	18.0 (+)
Lincomycin	30 "	38.0 (卅)	34.0 (卅)	30.0 (卅)	27.5 (卅)
Sulfisoxazole	400 "	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)
Nalidixic acid	50 "	16.0 (+)	— (—)	18.0 (+)	± (±)

表 3 婦人生殖器から分離した *Mycoplasma* の各種抗菌性物質に対する感受性 (ディスク法)

Antibiotic	Concentration	阻 止 円 直 径 (mm)												
		No. 4	No. 11	No. 14	No. 22	No. 25	No. 44	No. 50	No. 64	No. 66	No. 74	No. 84	No. 86	No. 91
Penicillin	20 u	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Streptomycin	50 μ g	27.0	18.0	16.0	25.0	20.0	27.0	21.0	20.0	18.0	22.0	18.0	20.0	17.0
Chloramphenicol	100 "	34.0	28.0	27.0	30.0	32.0	30.0	32.0	30.0	32.0	32.0	27.5	30.0	26.0
Tetracycline	200 "	38.0	30.0	30.0	40.0	38.0	40.0	36.0	36.0	34.0	40.0	32.0	36.0	34.0
Erythromycin	50 "	40.0	35.0	33.0	41.0	37.0	42.0	40.5	38.0	38.0	40.0	34.0	36.0	33.0
Kanamycin	50 "	16.0	14.0	14.0	16.0	17.0	18.0	14.0	16.0	12.0	14.0	13.0	15.0	12.0
Cephaloridine	30 "	15.0	±	±	13.0	16.0	14.0	18.0	12.0	12.0	12.0	±	±	±
Lincomycin	30 "	30.0	24.5	21.0	30.0	25.0	30.0	28.0	26.0	22.0	27.0	24.0	27.0	20.0
Sulfisoxazole	400 "	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nalidixic acid	50 "	16.0	—	—	18.0	±	17.0	±	±	±	12.0	—	—	±

を作成, ディスク法では昭和ディスクを用いた。

実験成績

M. laidlawii および *M. campo* の Erythromycin および Tetracycline に対する感受性を, まずカップ法により測定した成績は表 1 に見るとおりである。2 剤ともに明瞭な阻止円を示し, かなりの感受性を示している。これにさきだち, Erythromycin で 5,000~0.5 μ g/ml まで 10 倍稀釈により, 実験を試みたが, 0.5 μ g/ml にも阻止円は現出した。

以上の成績で寒天平板拡散法の応用の可能性を確認したので, 次にディスク法の応用を *M. laidlawii*, *M. campo* および *M. hominis* に対する 10 種の抗菌性物質について試みた成績は, 表 2 に示すとおりである。()内には参考までに感受性を示した。

表 3 は, 私共が婦人生殖器から分離した 72 株のうち, *M. hominis* type と思われるもの (現在同定しつつある) 13 株をえらびディスク法による成績を示したものであ

る。対照株および私共の分離株すべてに, Penicillin および Sulfisoxazole は阻止円を呈せず, この両者には感受性はないものと認められた。Cephaloridine は *M. laidlawii* および *M. campo* で全く阻止円を示さなかつたが, *M. hominis* および私共の分離したものに狭いながら阻止円を認め, また Nalidixic acid は *M. campo*, *M. hominis* II 型および私共の分離株のうち数株に小阻止円を呈したのみであつたが, 他の薬剤はいずれも感受性を示し, とくに Erythromycin, Tetracycline, Chloramphenicol および Lincomycin に 30~40 mm 以上の大きな阻止円が見られ, Streptomycin および Kanamycin も大部分高感受性を示した。なお本実験で種層用に用いた培地の寒天濃度が約 1% となり, 従来の感受性テスト用寒天平板に比し低く, これが抗生物質の拡散性ならびに感度に対する影響を検討するため, 大腸菌およびブドウ球菌を試験菌とし, 寒天濃度 1.5% と 1% の平板を作り, Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol および Tetracycline の 4 剤に対する阻止円を現出させて比較したが, 両者に全く差が見られなかつた。

なお, これらディスク法により測定した成績が, 稀釈法により測定したものと差があるかどうか検討するため, 上記の 10 種の抗菌性物質の *M. laidlawii*, *M. campo* および *M. hominis* に対する最小発育阻止濃度を寒天平板稀釈法で測定した。接種は *Mycoplasma* の血清加 soy-peptone broth 培養を毛細管ピペットで 1 滴ずつ行ない, 判定は 48 時

表 4 *M. laidlawii*, *M. campo* および *M. hominis* に対する各種抗菌性物質の最小発育阻止濃度 (寒天平板稀釈法)

Antibiotic	濃 度 (u/ml or μ g/ml)			
	<i>M. laidlawii</i>	<i>M. campo</i>	<i>M. hominis</i> I	<i>M. hominis</i> II
Penicillin	>1.000	>1.000	>1.000	>1.000
Streptomycin	1.25	1.25	1.25	2.5
Chloramphenicol	0.65	1.25	1.25	1.25
Tetracycline	1.25	1.25	1.25	1.25
Erythromycin	0.65	1.25	1.25	1.25
Kanamycin	1.65	3.12	3.12	3.12
Cephaloridine	>100	>100	25	25
Lincomycin	1.25	1.25	1.25	1.25
Nalidixic acid	25	>100	25	100

間後、弱拡大顕微鏡で集落形成の有無をもつて行なつた。その成績は表4に見るとおり、ディスク法により測定した感性感度によく一致した。

総 括

細菌の感受性測定には、現在その簡便法からディスク法などの寒天平板拡散法が臨床的に広く行なわれている。今後、多数に分離されるであろう *Mycoplasma* においても、この方法が普遍化するものと考えられるが、*Mycoplasma* の場合、一般細菌よりも培養が容易でないため、そのままでは応用が困難である。私共の教室では、以前から宮村らにより、寒天平板拡散法に還元色素処置を応用することが試みられてきた。その目的は、ある場合は迅速検定^{16,17)}であり、ある場合は培養困難な細胞への応用^{18,19)}である。今回はこれを *Mycoplasma* に適用しうるかどうかが検討した。既に PERLMAN²⁰⁾ とも同様の方法を抗 *Mycoplasma* 物質の探求に用いているが、私共は、臨床的に感受性測定の目的に使用したものである。その結果は本実験の成績が示すとおり、充分実際応用にたえることを認めた。

本実験において、時には阻止円が明瞭に現れないこともあつたが、分離株の接種菌数、使用する血清および培養時間等により明瞭な阻止円を現出せしめることができた。本成績は菌数 10^{10} 個/ml、ヒト血清、24時間培養に統一した結果である。*Mycoplasma* の薬剤感受性は、諸家の報告によつても、種および株の相違が非常に大きく、ことに Macrolide 系抗生物質についてそれが著しい。私共の成績では Erythromycin は供試菌に感受性高く、これは荒井らの報告と一致している。また本実験では、対照株および私共が婦人生殖器から分離した株に関する限り、かなり共通した感受性を示した。しかし Cephaloridine および Nalidixic acid に対し Species により僅かながら差が見られた。また Cell wall を有しない *Mycoplasma* が、Penicillin に不感性であることは当然と考えられるが、同じ種類の Cell wall inhibitor とされている Cephaloridine が Penicillin と少し異なつた態度を示したことは、これら物質の作用機転の上に何らかの示唆を与えるものであろう。なお上記の成績は稀釈法による結果と比較され、その成績はよく一致した。

対照株、ことに *M. hominis* I型およびII型(表2)と私共の分離株(表3)に相当の共通点が認められたことは、分離株が *M. hominis* であろうことを推定させる。今後、さらに分離株については、確実な同定を行ない、この間の関係について追求すると共に、今回実験を省いた *M. fermentans* についても、本実験と同様な試みを行なう予定である。

結 論

Mycoplasma の薬剤感受性測定に、ディスク法を応用し、2,6-dichlorophenolindophenol 処置により、24時間で結果を判定、10種の薬剤の供試 *Mycoplasma* に対する感受性は Erythromycin, Tetracycline, Chloramphenicol, Lincomycin, Streptomycin および Kanamycin は高度であつたが、Nalidixic acid および Cephaloridine は極めて低く、Penicillin および Sulfisoxazole は全く認められなかつた。これらの成績は、寒天平板稀釈法による結果とよく一致し、本法の応用性を確認した。

謝辞：標準株を分与された慶応大学医学部微生物学教室 佐々木正五教授、および東芝生物物理化学研究所 伊東平八博士に深謝の意を表する。

参 考 文 献

- 1) KLIENEBERGET-NOBEL, E.: PPLO in human vagina. Lancet 2: 46~47, 1945
- 2) 本間 遜, 草野信男: 慢性肺炎の分泌物及び尿道口より PPLO の分離. 臨床 5(12): 72~73, 1952
- 3) 佐々木正五: PPLO 概論. モダンメディア 11: 2~6, 1965
- 4) 石田名香雄, 荒井澄夫: *Mycoplasma pneumoniae* の分離法. モダンメディア 11: 26~30, 1965
- 5) 尾形 学, 太田哲英: 動物の PPLO 疾病との関係. モダンメディア 11: 31~45, 1965
- 6) CHANOCK, R. M.: Biology of the PPLO. Proc. Nat. Acad. Sci. 48: 41~49, 1962
- 7) EVANS, A. S.; ALLEN, V. & SUELTMAN, S.: *M. pneumoniae* infections in University of Wisconsin students. Amer. Rev. Resp. Dis. 96(2): 237~244, 1967
- 8) JONES, D. M.: *Mycoplasma hominis* abortion. Brit. Med. J. 5536: 338~340, 1967
- 9) ROBINSON, L. B., WICHELHAUSEN, R. H., & BROWN, T. MCP.: Sensitivity studies on human pleuropneumonia-like organisms. J. Lab. Clin. Med. 39: 290~320, 1952
- 10) OSBORN, O. H.; MATANEY, C. E. & POMEROY, B. S.: The effects of antibiotics on the infectious sinusitis agent of turkeys: The *in vitro* development of antibiotic resistant strains of *Mycoplasma*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 79: 581~587, 1960
- 11) KÖHLER, W.: Antibiotikaempfindlichkeit humaner PPLO-Stämme. Zentb. F. Bact. 185: 355~366, 1962
- 12) GODZESKI, C. W. & PAVEY, D. E.: A sensitive assay for inhibitory agents of pleuropneumonia-like organisms. Nature 205: 1017~1018, 1965
- 13) ARAI, S.; YOSHIDA, K.; IZAWA, A., KUMAGAI, K. & ISHIDA, N.: Effect of antibiotics on growth of *Mycoplasma pneumoniae* Mac. J. Antibiotics, Ser. A 19(3): 118~120, 1966

- 14) PERLMAN, D.; RAHMAN, S. E. & SEMAR, J. B.. Antibiotic control of *Mycoplasma* in tissue culture. *Appl. Microbiol.* 15(1) : 82~85, 1967
- 15) BUSKIRK, H. H.. Control of pleuropneumonia-like organisms in cell culture. *Appl. Microbiol.* 15 : 1442~1446, 1967
- 16) 宮村定男, 小林良彦: ペニシリン迅速検定法について。 *J. Antibiotics* 1(8) : 510~512, 1948
- 17) 金沢 裕: 2,6-dichlorophenolindophenolを標示色素とする迅速検定法。 *J. Antibiotics* 2(5) : 315, 1949
- 18) 伊藤泰一, 宮村定男, 桶谷修三: 寒天平板法による抗生物質の抗原性測定について。 *J. Antibiotics, Ser. B* 9(3) : 114~116, 1956
- 19) MIYAMURA, S. & NIWAYAMA, S.. An agar plate diffusion method using HeLa cells for antitumor screening. *Antibiot. & Chemoth.* 9(8) : 497~500, 1957
- 20) PERLMAN, D. & SCHWARTZ, J. L.: An agar diffusion method for evaluation of antimycoplasma substances. *J. Antibiotics* 21(6) : 399~401, 1968

A DISC METHOD FOR SENSITIVITY TESTING OF *MYCOPLASMA* SPECIES

AKIO TAKANO, OSAMU KITAMI and SADA O MIYAMURA

Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine, Niigata

A disc agar plate method, using 2,6-dichlorophenol indophenol as the indicator, for the routine testing of the susceptibility to chemotherapeutic agents of *Mycoplasma* species has been developed. Of the 10 drugs used, 17 *Mycoplasma* cultures were highly sensitive in erythromycin, tetracycline, chloramphenicol, lincomycin, streptomycin and kanamycin, low in cephaloridine and nalidixic acid and not at all in penicillin and sulfisoxazole.