

## *Mycoplasma pneumoniae* に対する Doxycycline の *in vitro* 抑制作用

山地幸雄 高橋昌巳 留目優子・大国寿士

日本医科大学細菌学教室

*Mycoplasma pneumoniae* による肺炎<sup>1) 2) 3) 4)</sup>は、近年注目されており、本邦においてもいくつかの論文がある<sup>5) 6) 7) 8)</sup>。*M. pneumoniae* 感染に対し Tetracycline 系の抗生剤が有効なことは、KINGSTON らの実験以来主張されているところで<sup>9) 10) 11) 12)</sup>、無細胞培地における感受性試験としては ARAI ら<sup>13) 14)</sup>、GODZESKI ら<sup>15)</sup>、JAO ら<sup>16)</sup>、北本<sup>6)</sup>、LARIN ら<sup>17)</sup>、SMITH ら<sup>11)</sup>、SLOTKIN ら<sup>18)</sup>の報告がある。

われわれは、標準株 M<sub>Ac</sub> および、異型肺炎を疑われた患者上気道より分離された *M. pneumoniae* 株の、Tetracycline 系薬剤、特に Doxycycline<sup>19) 20) 21)</sup> 感受性を測定したので、その大要を報告する。

### 材料および方法

培地：CHANOCK ら<sup>4)</sup>の処方に基づき、PPLO broth, W/O crystal violet (Difco) 70% v/v, 非加熱ウマ血清 20% v/v, 25% 酵母エキス (オリエンタル乾燥酵母より製造) 10% v/v, ブドウ糖 1% v/v, Thallium acetate 1/2,000 に Phenol red 0.002%, Penicillin 500 u/ml を加えたものを液体培地とした。固形培地は PPLO broth の代りに PPLO agar, W/O crystal violet (Difco) を用いるか、あるいは上記液体培地に Specia<sub>1</sub> noble agar (BBL) を 0.8% に加えたものとした。固形培地の保存、培養は防乾箱に収めて行なつた。

***Mycoplasma*株**：東大医科研より北本博士の御好意により分与された M<sub>Ac</sub> 株および、1967年11月～1968年2月に日本医大付属病院小児科 (K) および、都内某診療所 (A) において、異型肺炎の疑いの患者より分離された6株を用いた。患者よりの分離は、咽頭拭い液を材料として、CHANOCK ら<sup>4)</sup>の固形培地あるいは2相培地<sup>22)</sup>を用いて行ない、*M. pneumoniae* の同定は、ブドウ糖分解、モルモット赤血球溶血および吸着によつた<sup>1) 5) 10) 23)</sup>。抗生剤感受性試験の接種材料は、上記各種の液体培養液 0.3～0.5 ml を、10 ml 液体培地を入れた中試験管に接種し、36°C 6～7日後に培地の黄変した時期に 2 ml ずつ小分けし、急速に凍結させて -20°C に保存した *Mycoplasma* 液 (10<sup>6</sup>～10<sup>7</sup> CFU/ml) とした。感受性試験時の人工培地継代数は：M<sub>Ac</sub>, 医科研受領後1代；A-1, 患者材料より分離後7代；A-5, 6代；K-3, 6代；K-4, 8代；K-5, 8代；K-30, 4代である。

**Tetracycline 系抗生剤**：実験に用いた薬剤は Tetracycline-HCl (Achromycin), Chlortetracycline (Aureomycin), Methacycline (Randomycin), Doxycycline (Vibramycin) および Demethylchlortetracycline (Ledermycin) の6種である。これらの薬剤は、1 mg/ml 留水溶液を原液として 4°C に保存し、1週間を経過したものは廃棄した。

**MIC (最小発育阻止濃度)の測定**：抗生剤の2倍階段希釈を、液体培地あるいは固形培地により作り、液体培地は 2.5 ml ずつを滅菌小試験管 (10×800 mm) に、固形培地は 3 ml ずつを滅菌 3 cm ガラス ペトリ皿に分注した。これらの液体培地あるいは固形培地表面に、上記の接種材料あるいはその PPLO broth 希釈液を接種し、36°C に約10日間培養して、培地の pH 変化を経日的に肉眼で観察し、*Mycoplasma* を接種しない対照と同一の色調の最小濃度を MIC とした。なお、接種材料の CFU (Colony forming unit) は、実験のたびにごとに毎回、固形培地表面に10倍階段希釈液 0.1 ml を接種し、36°C 10日間培養して検定測定した。

### 結果

**MIC 測定方法の検討**：Doxycycline 加培地に M<sub>Ac</sub> 株の 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> および 10<sup>3</sup> CFU/0.1 ml を接種し、36°C に培養すると、表1に示すように、液体培地はそれぞれ、6, 8, 8, 13日後に黄色の終末色調に達し、この時の MIC はそれぞれ 1.56, 1.56, 0.78 および 0.78 mcg/ml であつた。固形培地表面に 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> お

表1 *Mycoplasma pneumoniae* M<sub>Ac</sub> 株の Doxycycline 感受性

培地	接種 <i>Mycoplasma</i> 量 (CFU)	終末黄色		明らかな色調黄変	
		培養日数	MIC (mcg/ml)	培養日数	MIC (mcg/ml)
液体培地	10 <sup>6</sup>	6	1.56	5	0.78
	10 <sup>5</sup>	8	0.39	6	0.39
	10 <sup>4</sup>	8	0.78	6	0.2
	10 <sup>3</sup>	13	0.78	9	0.2
固形培地	10 <sup>6</sup>	5	3.12	3	3.12
	10 <sup>5</sup>	8	3.12	5	0.78
	10 <sup>4</sup>	8	3.12	5	0.39
	10 <sup>3</sup>	8	0.78	8	0.78

よび  $10^3$  CFU/0.1 ml を接種した場合には、終末色調はそれぞれ 5, 8, 8 および 8 日後にみられ、この時期の MIC はそれぞれ、3.12, 3.12, 3.12 および 0.78 mcg/ml であった。

薬剤を加えない対照培地に、*Mycoplasma* 発育のための明らかな色調変化のみられる時期は、表 1 に示すように、終末色調に至る時期より 0~4 日早く、またその際の MIC は 0~2 管低い。

液体培地と固形培地とを較べると、MIC は後者の方が高い。

*Mycoplasma pneumoniae* の無細胞培地における感受性試験は、研究者により、その方法がまちまちで<sup>6) 11) 13) 14) 15) 16) 17) 18)</sup>一定の方法がないので、われわれは、液体培地に  $10^5$ ~ $10^6$  CFU *Mycoplasma* を移植して、対照培地が終末の黄色々調に達した時期の MIC を採用した。その理由は、1) 固形培地表面に  $10^5$  CFU 以上接種すると、Tetracycline 100 mcg/ml, あるいは Doxycycline 25 mcg/ml の培地にも、*Mycoplasma* 集落が認められ、判定に困難が伴う上、あまりにも高い CFU となる。2) Tetracycline 系薬剤のあるものは、 $30^\circ\text{C}$  でかなり急速に失活するから<sup>17) 25)</sup>、培養日数は短い方がよい。3) 一般に細菌の感受性試験は、対照培地における菌の発育が終末に達している 18~24 時間培養後に判定される。4) 培地色調が終末に達した時期には、 $10^5$  と  $10^6$  CFU 接種との MIC は同一である。5) *Mycoplasma* 株によっては、無薬剤対照培地の色調が *Mycoplasma* 接種培養数日後に 1 夜にして、無接種培地の色調から終末色調に変わることがあるからである。

**液体培地での Tetracycline 系抗生剤感受性：**上記の実験方法による、7 株の *Mycoplasma pneumoniae* に対する 6 種薬剤の MIC は表 2 に示すとおりで、Doxycycline 1.56~3.12 mcg/ml, Tetracycline 1.56~3.12 mcg/ml, Demethylchlortetracycline 3.12~12.5 mcg/ml, Oxytetracycline 6.25~12.5 mcg/ml, Methacycline 6.25~25 mcg/ml, Chlortetracycline 12.5~>25 mcg/ml であった。6 種薬剤の抗 *Mycoplasma* 効果は、図 1 のとおりで、(Doxycycline) > (Tetracycline) > (Demethylchlortetracycline) > (Oxytetracycline) > (Methacycline) > (Chlortetracycline) の順となる。

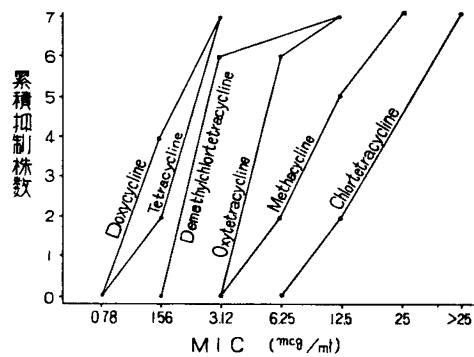
各々の株についてみると、標準 MAC 株と患者分離株との間に、K-3/Demethylchlortetracycline の例外的な場合を除き、2 管以上の MIC の差はなかった。

表 2 *Mycoplasma pneumoniae* 7 株の Tetracycline 系抗生剤感受性

検査株	培養日数	MIC (mcg/ml)					
		TC	OTC	CTC	MTC	DMCT	DOTC
MAC	6	3.12	6.25	>25	12.5	3.12	1.56
A-1	5	1.56	6.25	>25	6.25	3.12	1.56
A-5	5	3.12	6.25	12.5	6.25	3.12	1.56
K-3	5	1.56	12.5	>12.5	12.5	12.5	3.12
K-4	5	3.12	6.25	25	25	3.12	3.12
K-5	5	3.12	6.25	>12.5	12.5	3.12	1.56
K-30	6	3.12	6.25	12.5	12.5	3.12	3.12

TC: Tetracycline, OTC: Oxytetracycline, CTC: Chlortetracycline, MTC: Methacycline, DMCT: Demethylchlortetracycline, DOTC: Doxycycline

図 1



### 考 察

*Mycoplasma pneumoniae* の無細胞培地における抗生剤感受性試験の報告は、すでにいくつかあり、われわれも Tetracycline 系以外の薬剤についての実験を行なっているが<sup>25)</sup>、今回は MAC 株および、1967 年 11 月~1968 年 2 月の患者分離株の、6 種 Tetracycline 系薬剤感受性について報告した。

従来研究者の MIC 測定の報告をみると、いずれも CHANOCK ら<sup>4)</sup> の培地、あるいはその変法を用いているが、被検株、接種量および判定の規準がいくらか異なる。ARAI ら<sup>13) 14)</sup> は、MAC, FH, および患者分離株の固形培地混釈法による、Pulp disk diffusion method を採用して、判定は集落生成および培地低下の抑制を規準とし、GODZESKI ら<sup>15)</sup> は Resazurin を指示薬として加えた液体培地に、かなり大量の FH 株を接種して、30~36 時間培養後の培地色調変化をみており、JAO ら<sup>16)</sup> は MAC, FH, および患者株の  $10^2$ ~ $10^3$  CFU を、等量の液体培地に加えて、培養後の pH 低下をみた。35 株

について行なつた SYLVESTER<sup>26)</sup> および, FH 株による LARIN ら<sup>17)</sup> の実験は, かなりわれわれの方法と似ている。SMITH ら<sup>11)</sup> は, PI 1428 株による人体実験と平行して, 培地 pH の低下を規準とした感受性試験を行なつたが, 接種量についての詳しい記載はない。SLOTKIN ら<sup>18)</sup> は, MAC その他 10 株について, 培地 pH の低下を規準としない直接的な方法により増殖抑制をみているが, 接種量は  $10^4$  CFU である。

これらの研究者の報告をみると, 固形培地を用いた実験<sup>13)</sup><sup>14)</sup>, および *Mycoplasma* の増殖そのものをみたそれ<sup>3)</sup><sup>18)</sup> では, 相対的に MIC は高く, われわれの指摘した傾向と一致する。今回の報告と似たやり方の実験<sup>17)</sup><sup>26)</sup> では, 使用 *Mycoplasma* 株は同一でないが, われわれの得た MIC とおおむね一致する。

GODZESKI ら<sup>15)</sup> は, 大量の FH 株接種による 30~36 時間培養後の Tetracycline の MIC は 0.04 mcg/ml と報告したが,  $10^7$  CFU/0.1 ml の MAC 株を液体培地に接種した際, われわれの判定規準による Doxycycline の MIC が 4 日培養後に 0.39 mcg/ml であつたことは, われわれも経験しており, 培地 PR 黄変は  $10^6$  CFU/ml に達したとき起るとの所見<sup>13)</sup> からいつても, このような大量接種では, *Mycoplasma* の増殖よりも, 特定の代謝阻害を観察していることになるのではないかと思う。その他の研究者の報告にみられる MIC は, われわれの成績とくらべていずれも低いが, これは接種量および終末点すなわち判定時期の決定に問題があるようで, この点は Macrolide 系の薬剤の場合と異なり, 慎重を要する点であろう。

Tetracycline 系薬剤の抗 *Mycoplasma* 効果の比較は, ARAI ら<sup>13)</sup><sup>14)</sup>, JAO ら<sup>16)</sup>, LARIN ら<sup>17)</sup> の報告にみられ, われわれの成績は JAO ら<sup>16)</sup> のそれとほとんど一致する。ただし, Tetracycline 系薬剤は, degradation の速度がそれぞれ異なるので終末判定までに数日を要する抗 *Mycoplasma* テストで得られた順序が, そのまま人体適用の価値と一致すると考えるのは早計である。換言すると, Tetracycline に較べて Oxytetracycline は, また Chlortetracycline はさらに, degradation が速いとの, よく知られた事実があるからである<sup>34)</sup>。この問題は, 薬剤の血中あるいは臓器内持続時間も関連して考えなければならぬであろう。なお, LARIN ら<sup>17)</sup> は, 特に, Methacycline は蛋白の存在において失活しやすいが, 血清のない環境でのその mycoplasmocidal 効果は Tetracycline より強力であると主張した。

われわれの成績では, 標準 MAC 株と患者分離株との間に, それぞれの Tetracycline 系薬剤に対する感受性

の差異をほとんど認めなかつたが, これは薬剤との接触により, *in vitro*<sup>16)</sup> および *in vivo*<sup>11)</sup> で耐性 *Mycoplasma* は生じなかつたとの, 他の研究者の知見を支持するものであるかも知れない。

#### 結 論

1) MAC 株および 1967 年 11 月~1968 年 2 月に患者より分離された 6 株の *Mycoplasma pneumoniae* の 7 種 Tetracycline 系薬剤に対する感受性を, 無細胞培地で測定した。

2) 被験薬剤の抗 *Mycoplasma* 効果は, MIC によると, (Doxycycline) > (Tetracycline) > (Demethylchlortetracycline) > (Oxytetracycline) > (Methacycline) > (Chlortetracycline) の順であつた。

3) 標準 MAC 株と患者分離の 6 株との間に, 感受性の明白な差異はなかつた。

4) 無細胞培地での抗 *Mycoplasma* テストの実験法および結果の解釈について考察を加えた。

この論文の要旨は第 16 回日本化学療法学会 (1968) に報告された。

貴重な菌株を分与された医科研 北本教授ならびに, *Mycoplasma* 株の分離に御援助を与えられた日本医大 木田教授に御礼申し上げる。

#### 参 考 文 献

- 1) CHANOCK, R.M., M. A. MUFSON, N. L. SOMMERSON & R. B. COUCH: Role of *Mycoplasma (PPL0)* in human respiratory disease. Am. Rev. Resp. Dis. 88, Part 2: 218~231, 1963
- 2) RIFKIND, D, R. M. CHANOCK, H. KRAVEIZ, K. JOHNSON & V. KNIGHT: Ear involvement (myringitis) and primary atypical pneumonia following inoculation of volunteers with EATON agent. Am. Rev. Resp. Dis. 85: 479~489, 1962
- 3) CHANOCK, R. M., L. DIENES, M. D. EATON, *et al.*: Proposed nomenclature for atypical pneumonia organisms (EATON agent). Science 140: 662~662, 1963
- 4) CHANOCK, R. M., L. HAYFLICK & M. F. BARILE: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPL0. Proc. Natl. Acad. Sci. 48: 41~49, 1962
- 5) 荒井澄夫, 日沼頼夫, 石田名香雄: 原発性異型肺炎の病原体 *Mycoplasma pneumoniae* の分離。日本医事新報 2117: 18~29, 1964
- 6) 北本 治: ウイルスおよびマイコプラズマ性肺炎。日内会誌 56: 1065~1083, 1967
- 7) 出口雅経: マイコプラズマ肺炎。小児科臨床 20: 1329~1339, 1967
- 8) 梅津征夫: マイコプラズマ感染症。小児科臨床

- 21: 97~104, 1968
- 9) KINGSTON, J. R., R. M. CHANOCK, *et al.*: EATON agent pneumonia, II. Treatment with demethylchlortetracycline. *J. A. M. A.* 176: 118~123, 1961
  - 10) CHANOCK, R. M.: *Mycoplasma* infection of man. *New Engl. J. Med.* 273: 1199-1206, 1257~1264, 1965
  - 11) SMITH, C. B., W. T. FRIEDEWALD & R. M. CHANOCK: Shedding of *Mycoplasma pneumoniae* after tetracycline and erythromycin therapy. *New Engl. J. Med.* 276: 1172~1175, 1967
  - 12) HAYFLICK, L. & R. M. CHANOCK: *Mycoplasma* species of man. *Bact. Rev.* 29: 185~221, 1965
  - 13) ARAI, S., K. YOSHIDA, A. IZAWA, K. KUMAGAI & N. ISHIDA: Effect of antibiotics on growth of *Mycoplasma pneumoniae* MAC. *J. Antibiotics, Ser. A* 19: 118~120, 1966
  - 14) ARAI, S.; Y. YURI, A. KUDO, M. KIKUCHI, K. KUMAGAI & N. ISHIDA: Effect of antibiotics on the growth of various strains of *Mycoplasma*. *J. Antibiotics, Ser. A* 20: 246~253, 1967
  - 15) GODZESKI, C. W. & D. E. PAVEY: A sensitive assay for inhibitory agents of pleuropneumonia-like organisms. *Nature* 205: 1017~1018, 1965
  - 16) JAO, R. L. & M. FINLAND: Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to 21 antibiotics *in vitro*. *Amer. J. Med. Sci.* 253: 639~650, 1967
  - 17) LARIN, N. M. N. V. SARBY, G. M. WILLIAMSON, D. BUGGEY & N. S. KENWRIGHT: Laboratory studies on the sensitivity of *Mycoplasma pneumoniae* to the tetracyclines. 台糖フェイザー資料 Oct. 1967
  - 18) SLOTKIN, R. I., W. A. CLYDE, Jr. & F. W. DENNY: The effect of antibiotics on *Mycoplasma pneumoniae in vitro* and *in vivo*. *Amer. J. Epidemiol.* 86: 225~237, 1967
  - 19) VON WITTENAU, M. S., J. J. BEERBOOM, R. K. BLACKWOOD & C. R. STEPHENS: 6-Deoxytetracyclines, III. Stereochemistry at C-6. *J. Amer. Chem. Soc.* 84: 2645~2647, 1962
  - 20) ENGLISH, A. R.: 2-6-Deoxytetracycline, I. Some biological properties. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 122: 1107~1112, 1966
  - 21) ROSENBLATT, J. E., J. E. BARRETT, J. L. BRODIE & W. M. M. KIRBY: Comparison of *in vitro* activity and clinical pharmacology of doxycycline with other tetracyclines. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 134~141, 1966
  - 22) GRAYSTON, J. T., E. R. ALEXANDER, G. E. KENNY, E. R. CLARKE, J. C. FREUNDT, & W. A. MACCOLL: *Mycoplasma pneumoniae* infections; Clinical and epidemiologic studies. *J. A. M. A.* 191: 369~374, 1965
  - 23) SOMMERSON, N. L., D. TAYLOR-ROBINSON & R. M. CHANOCK: Hemolysin production as aid in identification and quantitation of EATON agent *Mycoplasma pneumoniae*. *Amer. J. Hyg.* 77: 122~128, 1963
  - 24) FINLAND, M. & L. P. GARROD: Demethylchlortetracycline. *Brit. Med. J.* 5204: 959~963, 1960
  - 25) 山地幸雄, 高橋昌巳, 大国寿士, 留目優子: Doxycycline (Vibramycin) の *Mycoplasma pneumoniae* 抑制. 第16回日本化学療法学会総会1968
  - 26) SYLVESTER, J. C.: JAO, *et al.* 16) より引用

## INHIBITORY EFFECT OF DOXYCYCLINE ON *MYCOPLASMA PNEUMONIAE IN VITRO*

YUKIO YAMAZI, MASAMI TAKAHASHI, HISASHI OKUNI & YUKO TODOME

Department of Bacteriology, Nippon Medical School

Inhibitory effect of six tetracyclines was studied on *Mycoplasma pneumoniae* MAC and six strains from patients.

Minimum inhibitory concentration was determined with color change of CHANOCK's fluid medium supplemented with glucose and phenol red. Reading was made when the color of drug free liquid medium turned final yellow by the acid production of *Mycoplasma*.

The mycoplasmostatic effect was observed in the following order: doxycycline, demethylchlortetracycline, methacycline, and chlortetracycline.

The experimental method for the mycoplasmostatic effect and its meaning was discussed.