

Chlamydia trachomatis の薬剤感受性

(第1報) Giemsa 染色と MicroTrak 法の比較

加藤 直樹・武田 明久・張 邦光・斎藤 昭弘
伊藤 康久・兼松 稔・坂 義人・西浦 常雄

岐阜大学医学部泌尿器科学教室

(主任：西浦常雄教授)

鄭 漢 彬

長浜赤十字病院泌尿器科

(昭和 60 年 3 月 28 日受付)

Chlamydia trachomatis の薬剤感受性試験を細胞培養法を用いて行なった。供試株は非淋菌性尿道炎由来の継代3回以内の臨床分離株で、薬剤は *C. trachomatis* を McCoy cell に接種、遠沈後に加えた。感受性値は Giemsa 染色と MicroTrak 法により封入体のみられなくなった最小阻止濃度 (MIC) を求めた。*C. trachomatis* 1 株についての接種量の感受性に及ぼす影響は doxycycline (DOXY), midecamycin (MDM), norfloxacin (NFLX), ampicillin (ABPC) のいずれの薬剤においてもほとんどみられなかった。臨床分離株 5 株に対する MIC は、Giemsa 染色では DOXY; $\leq 0.03 \mu\text{g/ml}$, MDM; $0.125 \sim 0.25 \mu\text{g/ml}$, NFLX; $16 \mu\text{g/ml}$, ABPC; $0.25 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ であった。MicroTrak 法では DOXY; $0.06 \sim 0.125 \mu\text{g/ml}$, MDM; $0.125 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$, NFLX; $16 \sim 32 \mu\text{g/ml}$ と Giemsa 染色による値より 2~3 倍高い MIC であった。ABPC では明らかな封入体は、 $0.25 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ でみられなくなったが封入体様蛍光物は $64 \mu\text{g/ml}$ でもみられた。MicroTrak 法は Giemsa 染色では検出できない薬剤の影響を受けた封入体も検出でき、より適正な感受性を求めることができるものと思われた。今回検討した 4 薬剤の中では DOXY が最も優れた MIC を示した。また MDM も比較的低い MIC 値で、臨床的效果が期待できるものと思われた。

Chlamydia trachomatis は非淋菌性尿道炎 (NGU), 副睾炎, 子宮頸管炎, トラコーマ, 封入体結膜炎, 新生児肺炎などの病原体として知られている¹⁾。わが国においては、最近になりようやくこれらの疾患から *C. trachomatis* が検出されるようになり、欧米と同様にわが国においても *C. trachomatis* の浸淫度がかなり高いことが明らかにされてきている^{2,3)}。

C. trachomatis 感染症の治療には doxycycline や minocycline などの tetracycline 系抗生剤が有効であるが^{4,5)}、本系統の抗菌薬に耐用性のない患者や周産期の女性や乳幼児においては他の抗菌薬の使用が望まれる。

われわれは *C. trachomatis* に有効な抗菌薬の選択とその臨床への応用を目的として、各種抗菌薬に対する *C. trachomatis* の薬剤感受性の検討を進めているが、今回はまず、細胞培養法を用いて *C. trachomatis* の接種、遠沈後に抗菌薬を添加する方法⁶⁾で感受性試験を行なった。また、その際、*C. trachomatis* の封入体を検出する方法として、従来法の Giemsa 染色と、*C. tra-*

chomatis の主要膜タンパクに特異的な FITC 標識モノクローナル抗体を利用した MicroTrak 法^{7,8)}を用い、両者の成績を比較検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. *C. trachomatis*

C. trachomatis は当教室において NGU 症例より分離された 6 株を用いた。

2. McCoy cell

培養細胞は、Dr. TAYLOR-ROBINSON より直接供与された McCoy cell を用いた。

3. 使用抗菌薬

doxycycline (DOXY; 台糖ファイザー), midecamycin (MDM; 明治製薬), norfloxacin (NFLX; 杏林), ampicillin (ABPC; 明治製薬) の 4 剤を使用した。

4. 感受性測定法

C. trachomatis 培養用の monolayer の調整法は先に報告したとおりである⁹⁾。McCoy cell は細胞分散剤 (0.25% trypsin 液 1 容量 + 0.02% EDTA 液 4 容量)

で個々の細胞に分散させた後、ウシ胎児血清 (FCS; Gibco) を4%の割合に加えた Eagle MEM[®] (kanamycin, phenol red 不含, -USSY) 溶液に 2×10^8 cells/ml になるよう浮遊させ、その 2 ml を直径 12 mm のカバースリップの入った培養チューブに分注し、18~24 時間培養した。形成された McCoy cell の monolayer は 1/15 M リン酸緩衝食塩水 (PBS), pH 7.4 で 2 回洗浄後、培養チューブ中に Eagle MEM 溶液に FCS, glucose, phenol red をそれぞれ 8%, 0.5%, 0.0006% になるよう添加した培養液 (8% FCS 加 CMG 培養液) を 1 ml ずつ分注し、さらに 10% FCS 加 sucrose-phosphate solution (2 SP, pH 7.0) に浮遊させた *C. trachomatis* を 5 μ l 接種した。培養チューブは大型遠心機 R-III (トミー精工) を用いて直ちに室温にて 2,850 G (4,500 rpm) で 1 時間遠心した。これを 37°C で 1 時間静置後、培養液を抗菌薬の入った 8% FCS 加 CMG 培養液にかえ、37°C で 48 時間培養した。

封入体の検出は Giemsa 染色と MicroTrak[™] *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen Test (第一化学) により行なった。方法の詳細はすでに報告した⁹⁾。*C. trachomatis* の封入体の検出には本来培養用の MicroTrak[™] 試薬 (Syva, 米国) が用いられるが、現在は国内では入手困難であるため、同じモノクローナル抗体である Direct Specimen Test 用の試薬を転用し、染色時間は 37°C で 15 分間とした。封入体の観察は、Giemsa 染色の場合には暗視野コンデンサー付顕微鏡 (カールツァイス) を用いて暗視野と明視野で観察し、MicroTrak の場合には蛍光顕微鏡 (B 励起フィルター, 530 nm カットオフフィルター付, オリンパス) を用いて行なった。

抗菌力は、封入体が検出できなくなった最小阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) として求めた。

II. 結 果

1. MIC に及ぼす *C. trachomatis* の接種量の影響

臨床分離株 1 株 (*C. trachomatis* UGU 931) を用いて、*C. trachomatis* の封入体が 1 カバースリップ当たり $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ inclusion-forming unit (ifu) になるよう調整した際の各 ifu における各抗菌薬の MIC の変動を、MicroTrak 法を用いて検討した。

DOXY ではいずれの ifu でも 0.03 μ g/ml の薬剤濃度で封入体が抗菌薬の無いときより小さく、かつ内容物は大きな粒子へと変化し (Fig. 1, 2), 0.06 μ g/ml で急激に封入体もしくは封入体様蛍光物はみられなくなった (Fig. 3)。

MDM においては 0.25 μ g/ml で封入体が小さくなる

とともに封入体数が激減し、10 ifu で封入体が検出できなくなったが、 10^5 ifu 以上ではいずれも 0.5 μ g/ml の濃度で封入体がみられなくなった (Fig. 4)。

NFLX においても封入体は小さくなりながら、いずれの *Chlamydia* 量でも同じ 32 μ g/ml の薬剤濃度で封入体は検出できなくなった (Fig. 5)。

ABPC ではいずれの *Chlamydia* 量においても 0.5 μ g/ml で典型的な封入体はみられなくなったものの、それ以上の薬剤濃度においても空胞様の蛍光陽性物質がみられた (Fig. 6, 7)。

2. 臨床分離株の感受性

C. trachomatis の臨床分離株 5 株の感受性測定に際して MIC は前述のように接種量により影響されないことが明らかとなったことから、*C. trachomatis* の接種量は、当教室における検討で NGU から分離される頻度が高い $10^3 \sim 10^4$ ifu/cover slip の *Chlamydia* 量²⁾を用いた。

MicroTrak 法を用いた検討では、いずれの薬剤でも MIC の幅は狭く、DOXY が最も良い抗菌力を示した (Table 1)。次いで MDM で、臨床的にはあまり効果の期待できない ABPC も、0.25~0.5 μ g/ml とかなり良い MIC がみられたが、封入体様物質は 64 μ g/ml でも認められた。NFLX の MIC は 16~32 μ g/ml で、比較的高い MIC 値であった。

Giemsa 染色による検討では、やはり MIC の幅はいずれの薬剤でも狭く、MIC 値は MicroTrak 法を用いたときより 1 管程高くなる株がみられた (Table 2)。ABPC においては、MicroTrak 法で 1 μ g/ml 以上の薬剤濃度でみられたような封入体様の物質は一切みられず、MIC は 0.25~0.5 μ g/ml と低い値であった。

III. 考 察

C. trachomatis の薬剤感受性測定法には種々の方法が考案されている。*C. trachomatis* の培養法としては、以前は発育鶏卵を用いる方法が利用されていたが、現在では細胞培養法を用いる方法が多用されている¹⁰⁻¹²⁾。薬剤の添加時期に関しては、*C. trachomatis* と薬剤とを混合してから培養細胞に接種したり¹¹⁾、培養細胞に封入体が形成されてから薬剤を添加する方法^{10,13,14)}がみられるが、現在最も多く用いられているのは、培養細胞に *C. trachomatis* を接種、遠沈し、細胞に附着させた後に薬剤を添加する方法^{6,15-17)}で、今回はこの方法を用いた。また、使用する *C. trachomatis* の株に関しては、初期の研究においては継代が何十回にも及ぶ reference strain が用いられているが、我々は臨床効果をより正しく予測する意味から当教室で NGU の症例から分離され、しかも継代数が 3 回以内のものを用いた。感受性値は封入体

Fig.1 A normal inclusion of *C. trachomatis* stained with MicroTrak ($\times 1,000$)



Fig.2 A damaged inclusion of *C. trachomatis* by doxycycline at a concentration of $0.03 \mu\text{g/ml}$ -MicroTrak technique ($\times 1,000$)



Fig.3 Efficacy of doxycycline on the growth of *C. trachomatis*, strain UGU 931

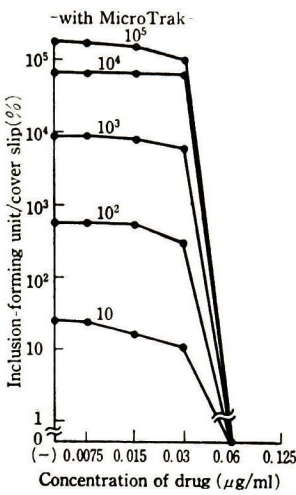


Fig.4 Efficacy of midecamycin on the growth of *C. trachomatis*, strain UGU 931

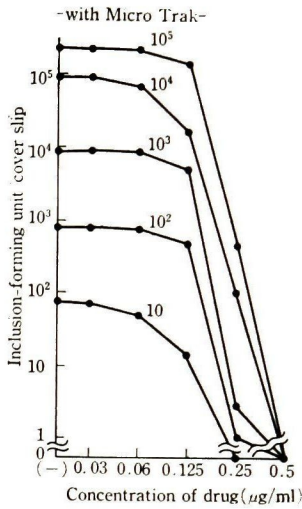


Fig.5 Efficacy of norfloxacin on the growth of *C. trachomatis*, strain UGU 931

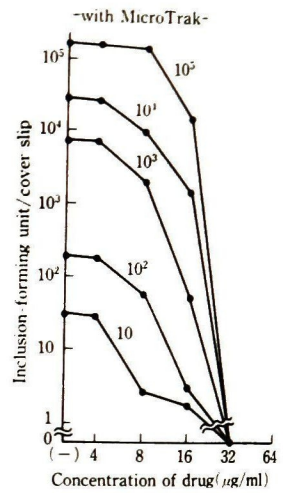
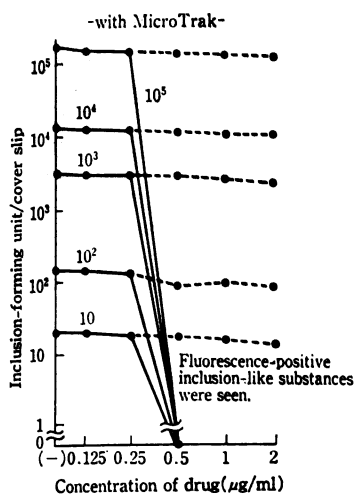


Fig.6 A chlamydial inclusion-like substance detected at a concentration of $1 \mu\text{g/ml}$ of ampicillin (MicroTrak technique, $\times 1,000$)

Fig.7 Efficacy of ampicillin on the growth of *C. trachomatis*, strain UGU 931



がみられなくなる最小阻止濃度 (MIC) を求める方法と、封入体形成の抑制がみられたものを継代し、chlamydicidal な濃度 (minimum chlamydicidal concentration; MCC) を求める^{11,13,15)} などの方法があるが、今回の検討では MIC のみを求めた。

C. trachomatis の接種量による感受性値の変動の検討では DOXY, MDM, NFLX では変動はみられず, ABPC でも明らかな封入体は同じ薬剤濃度でみられなくなった。また, ABPC では封入体様の蛍光物質はいずれの接種量においても 2 μg/ml の薬剤濃度でみられた。このように, *C. trachomatis* に対する検討薬剤の MIC 値は接種量に依存しないことが明らかとなったが, いずれの薬剤でも 10⁵ ifu の高接種量では *C. trachomatis* 未接種の対照ではみられない EB 様もしくは蛍光破片が MIC よりも 2~4 管高い薬剤濃度でもみられた。

臨床分離株 5 株を用いた各薬剤の MIC 値は Giemsa 染色では DOXY で ≤0.03 μg/ml, NFLX で 16 μg/ml, ABPC で 0.25~0.5 μg/ml であり, MicroTrak 法では DOXY で 0.06~0.125 μg/ml, NFLX で 16~32 μg/ml と DOXY の *in vitro* での優れた抗 *Chlamydia* 効果が示された。ABPC では明らかな封入体は 0.25~0.5 μg/ml でみられなくなったが, 封入体様のものは 64 μg/ml でもみられた。諸家の報告では MicroTrak 法を用いた報告はみられないが, 同様の方法で Giemsa もしくはヨード染色による MIC の成績は DOXY^{11,12,19)} で 0.0125~0.2 μg/ml, NFLX¹⁸⁾ で 8~16 μg/ml, ABPC^{11,13,15)} で 0.25~50 μg/ml に分布しており, 我々の成績と同様であった。一方, MCC 値に関しては DOX

Table 1 Susceptibilities of *C. trachomatis* isolated from nongonococcal urethritis to doxycycline, midecamycin, norfloxacin and ampicillin

Antimicrobials	MIC(μg/ml)-MicroTrak technique			
	DOXY	MDM	NFLX	ABPC
MIC range	0.06~0.125	0.125~0.5	16~32	0.25~0.5(>64)*
Strain # 1	0.06	0.25	16	0.5 (>64)
# 2	0.125	0.25	32	0.5 (>64)
# 3	0.06	0.5	32	0.25(>64)
# 4	0.06	0.25	16	0.25(>64)
# 5	0.06	0.125	32	0.5 (>64)

* Fluorescence-positive inclusion-like substances were seen.

Table 2 Susceptibilities of *C. trachomatis* isolated from nongonococcal urethritis to doxycycline, midecamycin, norfloxacin and ampicillin

Antimicrobials	MIC(μg/ml)-Giemsa staining			
	DOXY	MDM	NFLX	ABPC
MIC range	≤0.03	0.125~0.25	16	0.25~0.5
Strain 1	≤0.03	0.25	16	0.5
2	≤0.03	0.125	16	0.5
3	≤0.03	0.25	16	0.25
4	≤0.03	0.25	16	0.25
5	≤0.03	0.125	16	0.5

$Y^{12,13}$ で 0.015~0.2 $\mu\text{g/ml}$, NFLX¹⁰ で 8~64 $\mu\text{g/ml}$ と MIC とはほぼ同様であるが、個々にみると MIC 値より 1~3 管高くなっており、今回の MicroTrak 法における成績と Giemsa 染色における成績の関係に近いものと考えられる。一方、mecillinam や cephaloridine などの割合い MIC の低い β -lactam 剤でも MCC 値は継代するに従い漸増することが報告されており¹⁰, *Chlamydia psittaci* を用いた実験では、penicillin G は *C. psittaci* の発育を抑制するが、薬剤の除去によりまた発育を開始するといふ²⁰。MicroTrak を用いた今回の実験では、他の薬剤と異なり ABPC はいずれの濃度でも封入体もしくは封入体様蛍光物質が観察された。封入体様蛍光物質が生きた *C. trachomatis* を意味するか否かは継代培養による検討を行なわなければならない。しかし、*C. trachomatis* に対する ABPC の臨床効果は比較的悪く、したがって封入体様蛍光物質の高濃度における検出は意味を有するものとも考えられる。

MDM は erythromycin (EM) と同様に macrolide 系の抗生物質であるが、すでに報告されている EM の MIC 値^{13,14,19} とほぼ同様の値を示しており、臨床的にも EM と同様の効果が予測される。

文 献

- 1) TAYLER-ROBINSON, D. & B. J. THOMAS: The role of *Chlamydia trachomatis* in genital-tract and associated diseases. *J. Clin. Pathol.* 33: 205~233, 1980
- 2) 加藤直樹, 伊藤康久, 出口 隆, 兼松 稔, 坂義人, 河田幸道, 西浦常雄, 鄭 漢彬, 土井達朗, 酒井俊助, 松田聖士: *Chlamydia trachomatis* の尿道炎症患者からの分離。感染症誌 58: 29~38 1984
- 3) 沼崎 啓, 千葉峻三, 山中 樹, 中尾 享, 梅津征夫, 吉田 豊: 新生児結膜炎患児よりの *Chlamydia trachomatis* 分離。医学のあゆみ 126: 683~685, 1983
- 4) CDC: Sexually transmitted diseases treatment guidelines 1982. *MMWR* 31: 32 S~62 S, 1982
- 5) ORIEL, J. D. & G. L. RIDGWAY: Comparison of tetracycline and minocycline in the treatment of non-gonococcal urethritis. *Br. J. Vener. Dis.* 59: 245~248, 1983
- 6) BLACKMAN, H. J.; C. YONEDA, C. R. DAWSON & J. SCHACHTER: Antibiotic susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 673~677, 1977
- 7) STEPHENS, R. S.; C. C. KUO & M. R. TAM: Sensitivity of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in cell culture. *J.*

- Clin. Microbiol.* 16: 4~7, 1982
- 8) 西浦常雄, 加藤直樹, 中尾 享, 熊本悦明, 橋爪社, 北川龍一, 林 康之, 中村正夫, 長田尚夫, 小島弘敬, 赤尾順幸, 萩原敏且, 藤森一平, 高瀬善次郎: FITC 標識モノクローナル抗体 (MicroTrak™ 法) による *Chlamydia trachomatis* の検出。感染症誌 58: 1305~1314, 1984
- 9) 加藤直樹, 西浦常雄: クラミジアおよびウレプラズマと尿道炎, STD-病因, 診断, 治療-臨床と細菌, 75~91, 近代出版, 1984
- 10) POLLARD, M. & Y. TANAMI: Effects of antibiotics on trachoma virus in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107: 508~511, 1961
- 11) RIDGWAY, G. L.; J. M. OWEN & J. D. ORIEL: A method for testing the antibiotic susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in a cell culture system. *J. Antimicrob. Chemother.* 2: 71~76, 1976
- 12) TREHARNE, J. D.; J. DAY, C. K. YEO, B. R. JONES & S. SQUIRES: Susceptibility of *Chlamydiae* to chemotherapeutic agents. In: *Non-gonococcal urethritis and related infections* (HOBSON, D. & HOLMES, K. K. eds.) pp. 214~222, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1977
- 13) BOWIE, W. R.; C. K. LEE & E. R. ALEXANDER: Prediction of efficacy of antimicrobial agents in treatment of infections due to *Chlamydia trachomatis*. *J. Infect. Dis.* 138: 655~659, 1978
- 14) LEE, C. K.; W. R. BOWIE & E. R. ALEXANDER: *In vitro* assays for the efficacy of antimicrobial agents in controlling *Chlamydia trachomatis* propagation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 441~445, 1978
- 15) KUO, C.-C.; S.-P. WANG & J. T. GRAYSTON: Antimicrobial activity of several antibiotics and a sulfonamide against *Chlamydia trachomatis* organisms in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 80~83, 1977
- 16) SMITH, T. F. & H. E. WASHOTN: *In vitro* susceptibility of 30 strains of *Chlamydia trachomatis* to rosmacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 493~494, 1978
- 17) MOURAD, A.; R. L. SWEET, N. SUGG & J. SCHACHTER: Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 696~698, 1980
- 18) HEESSEN, F. W. A. & H. L. MUYTJENS: *In vitro* activities of ciprofloxacin, norfloxacin, piperimic acid, cinoxacin, and nalidixic acid against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 123~124, 1984
- 19) RIDGWAY, G. L.; J. M. OWEN & J. D. ORIEL: The antimicrobial susceptibility of *Chlamy-*

dia trachomatis in cell culture. Br. J. Ven-
er. Dis. 54: 103~106, 1978
20) MATSUMOTO, A. & G. P. MANIRE: Electron mi-

croscopic observations on the effects of peni-
cillin on the morphology of *Chlamydia psit-*
taci. J. Bacteriol. 101: 278~285, 1970

SUSCEPTIBILITY OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* TO ANTIMICROBIAL AGENTS

I. COMPARISON OF GIEMSA STAINING AND MICROTRAK TECHNIQUE FOR DETECTION OF CHLAMYDIAL INCLUSIONS

NAOKI KATOH, AKIHISA TAKEDA, PANG-KUANG CHANG,
AKIHIRO SAITO, YASUHISA ITO, MINORU KANEMATSU,
YOSHIHITO BAN and TSUNEO NISHIURA

Department of Urology, Gifu University School of Medicine

KANHIN TEI

Department of Urology, Nagahama Red Cross Hospital

Susceptibility test of *Chlamydia trachomatis* to antimicrobial agents was done by using cell culture method. *C. trachomatis* used were from nongonococcal urethritis and passaged less than 3 times. Antimicrobials were added to growth medium after *C. trachomatis* was inoculated onto monolayers of McCoy cells, centrifuged for one hour and incubated for one hour. Chlamydial inclusions were detected by both Giemsa staining and MicroTrak technique. The influence of inoculum size of *C. trachomatis* on their susceptibilities was not appeared in all 4 antimicrobial agents utilized; doxycycline (DOXY), midecamycin (MDM), norfloxacin (NFLX) and ampicillin (ABPC). The ranges of minimum inhibitory concentrations against 5 clinical strains were $\leq 0.03 \mu\text{g/ml}$ for DOXY, $0.125\sim 0.25 \mu\text{g/ml}$ for MDM, $16 \mu\text{g/ml}$ for NFLX and $0.25\sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ for ABPC using Giemsa staining. When using MicroTrak technique inclusions of *C. trachomatis* were detected at 2 to 3 times higher concentrations than those with Giemsa staining: $0.06\sim 0.125 \mu\text{g/ml}$ for DOXY, $0.125\sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ for MDM and $16\sim 32 \mu\text{g/ml}$ for NFLX. However, for ABPC inclusions-like substances were detected even at a concentration of $64 \mu\text{g/ml}$, a highest concentration used. MicroTrak technique seemed to be superior to Giemsa staining because inclusions damaged by antimicrobial agents were also detectable with MicroTrak technique and that produced more appropriate susceptibilities of *C. trachomatis*.