

## *Chlamydia trachomatis* の抗菌剤に対する *in vitro* 感受性測定法に関する研究

小 花 光 夫

川崎市立川崎病院内科

(指導：五島雅智子教授)

(昭和 61 年 11 月 4 日受付)

*Chlamydia trachomatis* (以下 *C. trachomatis*) の抗菌剤に対する *in vitro* 感受性測定法は本病原体の特異な増殖サイクルのためもあり未だ統一された方法がない。抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗微生物活性を Minimum inhibitory concentration (以下 MIC) として表示し、*C. trachomatis* に対する抗菌剤の MIC 測定法について電顕による観察も併用しながら種々検討した。

方法としては HeLa 229 細胞に *C. trachomatis* 標準株を接種後、2 倍希釈系列の被験抗菌剤を含む培地で 48 時間培養し、*C. trachomatis* 封入体の有無を FITC 標識抗 *C. trachomatis* モノクローナル抗体による直接蛍光染色でみた。封入体形成を阻止した最小抗菌剤濃度を被験抗菌剤の MIC とした。

結果：1) 電顕による封入体の観察から抗菌剤添加時期は *C. trachomatis* 接種直後が適切であった。

2) *C. trachomatis* 接種量は  $5 \times 10^3$  Inclusion forming unit/well が最も適切であった。

3) 各系統抗菌剤の *C. trachomatis* D/UW-3/Cx 株に対する MIC 測定ではテトラサイクリン系薬剤の MIC が 0.01~0.04  $\mu\text{g/ml}$  と良好な抗菌力を示した。マクロライド系薬剤では EM の MIC は 0.08  $\mu\text{g/ml}$  と比較的良好的な抗菌力であった。ピリドンカルボン酸系薬剤では OFLX の MIC が 0.64  $\mu\text{g/ml}$  であった。 $\beta$ -ラクタム系薬剤、アミノグリコシド系薬剤の MIC はすべて 81.92  $\mu\text{g/ml}$  以上であった。

*Chlamydia trachomatis* (以下 *C. trachomatis*) は近年、本邦においても非淋菌性尿道炎<sup>1)</sup>、新生児肺炎<sup>2)</sup>などの病原体として蔓延していることが明らかにされている。

本病原体は偏性細胞寄生性であり、かつ、一般細菌と異なった独特な増殖サイクルを有する。そのため、*C. trachomatis* の抗菌剤に対する *in vitro* での感受性測定法に関して、海外では RIDGWAY らによるものをはじめとしていくつかの報告<sup>3-5)</sup>があり、また、本邦では加藤ら<sup>6)</sup>による報告がなされているものの、まだ統一された方法はない。今回、著者は *C. trachomatis* の組織培養には 24-well dish を用い、抗菌剤の *C. trachomatis* への増殖抑制効果の確認には直接蛍光染色法および電子顕微鏡 (以下電顕) による観察を併用して、簡便、かつ実用的な抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗微生物活性 (以下抗菌力とする) の測定法について検討した。

### I. 方 法

#### 1. *C. trachomatis* 培養法

*C. trachomatis* の培養には既に報告<sup>1)</sup>した HeLa 229 細胞を増殖母地とした組織培養法を用いた。

滅菌 24-well dish (Becton Dickinson 社, Oxnard) の各 well にそれぞれ直径 13 mm の組織培養用カバーリップ (Lux 社, Naperville, サーマノックス) を入れ、 $3 \times 10^5$  個の HeLa 229 細胞を接種して 10% 牛胎児血清加 Eagle Minimum essential medium (MEM) 培地により CO<sub>2</sub> incubator 内で 20 時間培養した。培地除去後、30  $\mu\text{g/ml}$  の DEAE-dextran (Pharmacia 社, Upsala) を含有した Hanks 液を添加して 30 分間室温に放置し、細胞表面電荷を変えた。Hanks 液を除去した後、各 well 内の HeLa 229 細胞に *C. trachomatis* 標準株を含む SPG (Sucrose 0.075 g/ml, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.52 mg/ml, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.22 mg/ml, Glutamic acid 0.72 mg/ml) 液を 0.1 ml 接種し、dish ごと 900 g (2,200 rpm), 20°C

で 60 分間遠心した。SPG 液を除去した後、再度 10% 牛胎児血清加 Eagle MEM 培地を添加して、37°C、CO<sub>2</sub> incubator 内で 48 時間培養した。

## 2. 被験抗菌剤

Tetracycline (TC) (Lot No. 48396-338; 日本レダリー), Minocycline (MINO) (Lot No. 48893-0586; 日本レダリー), Doxycycline (DOXY) (Lot No. 406-580005; 台糖フェイザー), Erythromycin (EM) (Lot No. 35176; 大日本製薬), Midecamycin (MDM) (Lot No. MOMWS-03-1; 明治製薬), Josamycin (JM) (Lot No. JSM-B 291; 山之内製薬), Clindamycin (CLDM) (Lot No. 619 PY; 日本アップジョン), Lincomycin (LCM) (Lot No. 510 SP; 日本アップジョン), Rifampicin (RFP) (Lot No. 1308; 第一製薬), Ofloxacin (OFLX) (Lot No. 10-101; 第一製薬), Enoxacin (ENX) (Lot No. 3515; 大日本製薬), Ciprofloxacin (CPFX) (Lot No. 958396; バイエル薬品), Norfloxacin (NFLX) (Lot No. 04 Z 8170; 杏林製薬), Nalidixic acid (NA) (Lot No. 50 AA 33; 第一製薬), Ampicillin (ABPC) (Lot No. PAMC-4; 明治製薬), Piperacillin (PIP) (Lot No. OB 523; 富山化学工業), Cefmetazole (CMZ) (Lot No. 185 N; 三共), Cefoperazone (CPZ) (Lot No. OG 636; 富山化学工業), Latamoxef (LMOX) (Lot No. CDL 01; 塩野義製薬), Tobramycin (TOB) (Lot No. 9 MT 02 A; 塩野義製薬), Streptomycin (SM) (Lot No. SSMC-5; 明治製薬), Gentamicin (GM) (Lot No. USQ-GMC-O-M-6218; 塩野義製薬) の各抗菌剤それぞれの原末を滅菌蒸留水に溶解して、1,000 µg/ml の標準液を作製し、-20°C に凍結保存した。なお、蒸留水に不溶性のものについては、あらかじめ適当な溶媒に溶解して、その後蒸留水で希釈して -20°C に凍結保存した。これらを使用直前に溶かして、さらに 2 倍希釈系列で目的とする濃度に調整して用いた。

## 3. *C. trachomatis* 封入体の観察

### a) 直接蛍光染色法

直接蛍光染色は既に報告<sup>1)</sup>したようにカバースリップをリン酸緩衝生食液 (PBS) で洗浄して、99.5% エタノールで 10 分間固定後、FITC 標識抗 *C. trachomatis* モノクローナル抗体 (MicroTrak™ Culture Confirmation Test; DaiSyva 社) を用いた直接蛍光抗体法を施行した。蛍光顕微鏡 (Nikon 社, VFD-R) により *C. trachomatis* 封入体の有無を観察した。

### b) 電顕

電顕標本の作成にはカバースリップごと 2% グルタルアルデヒド (Ladd 社, Burlington) で 2 時間固定して PBS を入れ、一晚放置し、1% オスミウム酸

(Merck 社, Darmstadt) で 1 時間固定した後、エタノール (それぞれ 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) で順次脱水して、プロビレン・オキサイド (和光純薬, 大阪) で置換した。等量のプロビレン・オキサイド: Epok 812 (応研商事, 東京), 次いで Epok 812 に包埋後、ウルトラミクロトーム (2088, LKB 社, Bromma) により超薄切片を作製した。鉛, ウラニルによる二重染色を施行した後、電子顕微鏡 (日本電子, JEM-100 S) により *C. trachomatis* 封入体を観察した。

## 4. 抗菌力測定法

### a) 抗菌剤添加時期

*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 標準株を HeLa 229 細胞に  $5 \times 10^4$  Inclusion forming unit (IFU)/well 接種して、直後に抗菌剤を添加した場合と接種後 20 時間経過してから抗菌剤を添加した場合の 2 通りを行った。抗菌剤としては MINO を最終濃度でそれぞれ 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025 µg/ml とするように *C. trachomatis* 培養用 MEM 培地に添加した。*C. trachomatis* 接種 48 時間後に直接蛍光染色法と電顕のそれぞれにより *C. trachomatis* 封入体を観察した。なおコントロールとして MINO 0 µg/ml, すなわち PBS 対照のみを加えたものを用いた。

また、2 通りの抗菌剤添加時期で 48 時間後に培地を除去して 3 回洗浄後、*C. trachomatis* を HeLa 229 細胞ごと SPG 液 0.1 ml に回収して、それを新たに HeLa 229 細胞に再接種して、抗菌剤を含まない培地で 48 時間培養したものについても直接蛍光染色法により *C. trachomatis* 封入体の有無をみた。

この結果 (成績 1.a) に基づき、以後抗菌剤の添加時期は *C. trachomatis* 接種直後とした。

### b) *C. trachomatis* の接種量

*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 標準株の接種量を  $5 \times 10^4$  IFU/well から  $5 \times 10^2$  IFU/well まで 10 倍ごと 5 段階に変えて接種し、それぞれにおいて MINO を最終濃度で 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025 µg/ml とするように *C. trachomatis* 培養用 MEM 培地に添加した。各接種量において形成された封入体数を直接蛍光染色法で測定して比較した。なお、封入体数の算定においては蛍光顕微鏡視野内に長方形のわくを設定し、わく内を一視野としたが、この一視野は 1.3 mm × 0.9 mm に相当しており、原則的にはそれぞれ 10 視野についての封入体数を測定して平均した。

この結果 (成績 1.b) に基づき、以後の実験では *C. trachomatis* の接種量は  $5 \times 10^4$  IFU/well とした。

### c) 各種抗菌剤の抗菌力測定

*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 株, L<sub>2</sub>/434/Bubo 株の 2

種の標準株をそれぞれ  $5 \times 10^8$  IFU/well 接種して、接種直後に各種被験抗菌剤をそれぞれ最終濃度で 81, 92  $\mu\text{g/ml}$  から 0.0025  $\mu\text{g/ml}$  まで 2 倍希釈系列 (81, 92, 40, 96, 20, 48, 10, 24, 5, 12, 2, 56, 1, 28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025  $\mu\text{g/ml}$ ) で *C. trachomatis* 培養用 MEM 培地に添加した。直接蛍光染色により 48 時間後における *C. trachomatis* 封入体形成を阻止した最小抗菌剤濃度を測定し、これを被験抗菌剤の *C. trachomatis* に対する Minimum inhibitory concentration (以下 MIC) と規定した。

## II. 成績

### 1. 抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力測定法

#### a) 抗菌剤添加時期

コントロールとして PBS のみを添加して抗菌剤を添加しない培地で 48 時間培養されたものについて、*C. trachomatis* 封入体の直接蛍光染色とその電顕像を観察した。直接蛍光染色法では黄緑色に特異蛍光を発する多数の封入体のみられた (Photo. 1, 左)。電顕では HeLa 229 細胞の核を圧排して細胞質内に大きな封入体のみられ、その中には電子密度が濃く、かつ小型でヌクレオイドを持った Elementary body (以下 EB) が多数散在しており、EB に混じって比較的大型で電子密度の薄い Reticulate body (以下 RB) も認められた (Photo. 1, 右)。

*C. trachomatis* の接種直後に抗菌剤を添加した場合には、MINO 0.02  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度では直接蛍光染色法では封入体のみられず、また電顕による封入体の観察もできなかった。そして、再接種でも *C. trachomatis* 封入体のみられなかった。MINO 0.01  $\mu\text{g/ml}$  では直接蛍光染色で封入体のみられ、その電顕像では封入体の全体像はコントロールでみられたものと同様異なり、封入体は小さく、辺縁が不明瞭で大小不同の RB と思われる粒子が大部分であった。しかし、一部にコントロールでの封入体内部にみられていたと同様な EB の存在が観察された (Photo. 2)。そして、この濃度では再接種により

*C. trachomatis* 封入体が観察された。

*C. trachomatis* 接種後 20 時間経過してから抗菌剤を添加した場合には、MINO 0.16  $\mu\text{g/ml}$  の濃度においても直接蛍光染色法によりその大きさはコントロールと比較して小さいものの、コントロールとはほとんど区別し得ない *C. trachomatis* 封入体のみられていた (Photo. 3, 左)。しかし、電顕像ではこの封入体の中にコントロールでみられたような EB は全く存在せず、内部が不均一でかなり大きな RB がいくつかみられ、残りの大部分は膨化して、破裂した RB であった (Photo. 3, 右)。この濃度では再接種により *C. trachomatis* 封入体はみられなかった。*C. trachomatis* 接種後 20 時間経過してから MINO を添加した場合、0.01  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度で電顕にてコントロールとほぼ同様な成熟した EB が観察された (Photo. 4)。

#### b) *C. trachomatis* の接種量による差

*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 標準株の接種量が  $5 \times 10$  IFU/well においては MINO 濃度 0.08, 0.04, 0.02, 0.01  $\mu\text{g/ml}$  では直接蛍光染色法で封入体のみられず、0.005  $\mu\text{g/ml}$  では全視野で 2 個、0.0025  $\mu\text{g/ml}$  では全視野で 1 個の封入体のみられた。 $5 \times 10^2$  IFU/well においては MINO 濃度 0.08, 0.04, 0.02  $\mu\text{g/ml}$  では封入体のみられず、0.01  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 1~2 個、0.005  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 11 個、0.0025  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 21 個の封入体のみられた。 $5 \times 10^3$  IFU/well においては MINO 濃度 0.08, 0.04, 0.02  $\mu\text{g/ml}$  では封入体のみられず、0.01  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 8 個、0.005  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 30 個、0.0025  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 48 個の封入体のみられた。 $5 \times 10^4$  IFU/well においては MINO 濃度 0.08, 0.04, 0.02  $\mu\text{g/ml}$  ではそれぞれ毎視野 1~2, 3~4, 3 個の封入体様物質 (後述) がみられ、0.01  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 50 個、0.005  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 213 個、0.0025  $\mu\text{g/ml}$  では毎視野 94 個の封入体のみられた。 $5 \times 10^5$  IFU/well においては MINO 濃度 0.08, 0.04, 0.02  $\mu\text{g/ml}$  ではいずれも毎視野 0~1 個の封入体様物質のみられ、

Table 1 Number of inclusion bodies of *Chlamydia trachomatis* (D/UW-3/Cx) by direct immunofluorescence staining, using anti-*C. trachomatis* monoclonal antibody

Inoculum size (IFU/well)	Concentration of minocycline ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005	0.0025
$5 \times 10$	0	0	0	0	2/all fields	1/all fields
$5 \times 10^2$	0	0	0	1~2/field	11/field	21/field
$5 \times 10^3$	0	0	0	8/field	30/field	48/field
$5 \times 10^4$	1~22/field	3~42/field	32/field	50/field	213/field	94/field
$5 \times 10^5$	0~12/field	0~12/field	0~12/field	>250/field	>250/field	>250/field

IFU=Inclusion forming unit

(one field : 1.3 mm  $\times$  0.9 mm)

Photo. 1 Inclusion bodies of *C. trachomatis* observed by fluorescence microscopy (200X, left side) and by electron microscopy (right side) at 48 hours post inoculation in HeLa 229 cells, cultured by the medium without antimicrobial agent.

Many elementary bodies which contain the central dense nucleoid and several reticulate bodies are seen in the large inclusion on the right photograph.

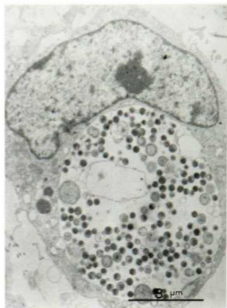
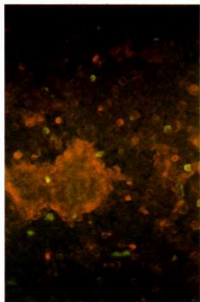


Photo. 2 Inclusion body of *C. trachomatis* observed by electron microscopy at 48 hours post inoculation in HeLa 229 cells, cultured by the medium containing 0.01 μg/ml of minocycline.

Appearance of this inclusion differs from that one on right side of Photo. 1, but a few elementary bodies (arrows) are seen in this inclusion.

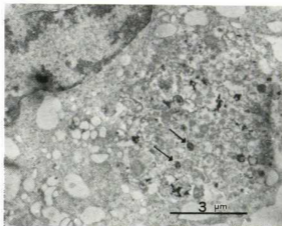


Photo. 3 Inclusion bodies of *C. trachomatis* observed by fluorescence microscopy (200X, left side) and by electron microscopy (right side) at 48 hours post inoculation in HeLa 229 cells, cultured by the medium containing 0.16  $\mu\text{g/ml}$  of minocycline from 20 to 48 hours after inoculation.

Inclusions on the left photograph are indistinguishable from those one on left side of Photo.1. Most particles of *C. trachomatis* are abnormally enlarged or ruptured reticulate bodies, and no elementary body is present in this inclusion on the right photograph.

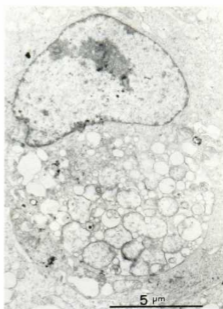
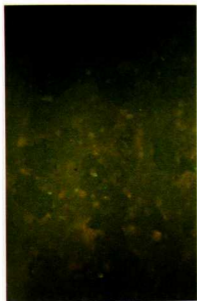


Photo. 4 Inclusion body of *C. trachomatis* observed by electron microscopy at 48 hours post inoculation in HeLa 229 cells, cultured by the medium containing 0.01  $\mu\text{g/ml}$  of minocycline from 20 to 48 hours after inoculation.

Appearance of this inclusion resembles that one on right side of Photo.3, but several elementary bodies are seen in this inclusion.

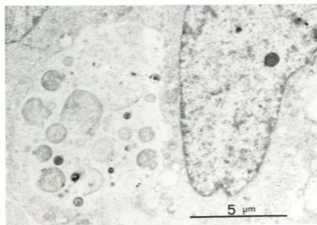
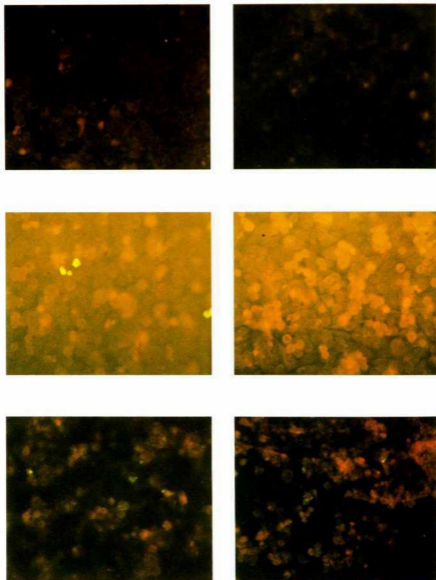


Photo. 5 Direct immunofluorescence staining, using FITC-labelled anti-*C. trachomatis* monoclonal antibody (200 $\times$ ).

Inoculum sizes of *C. trachomatis* are  $5 \times 10^7$  IFU/well (upper),  $5 \times 10^8$  IFU/well (middle) and  $5 \times 10^9$  IFU/well (lower), respectively. The antimicrobial concentrations are 0.01  $\mu\text{g/ml}$  of minocycline on the left photographs and 0.02  $\mu\text{g/ml}$  of minocycline on the right photographs, respectively. Inhibition for formation of inclusion by minocycline is most clear, when inoculum size is  $5 \times 10^8$  IFU/well. Many particles of *C. trachomatis* are present all over and the clusters of particles are seen like inclusions, when inoculum size is  $5 \times 10^9$  IFU/well.



0.01, 0.005, 0.0025  $\mu\text{g/ml}$  ではないずれも毎視野 250 個以上の封入体がみられた (Table 1)。

$5 \times 10^4$  IFU/well 接種した時の直接蛍光染色法では形成される封入体数が少ないため、各 MINO 濃度別の封入体形成抑制の差がはっきりしなかった (Photo. 5, 上段左, 右)。

$5 \times 10^4$  IFU/well および  $5 \times 10^8$  IFU/well 接種した時には封入体がみられなくなる最小 MINO 濃度は 0.02  $\mu\text{g/ml}$  と両者で同じであったが、封入体形成抑制の差は  $5 \times 10^8$  IFU/well の方が顕著であり、この接種量で封入体形成の有無が最も明確に区別可能であった (Photo. 5, 中段左, 右)。

$5 \times 10^4$  IFU/well および  $5 \times 10^8$  IFU/well 接種した時には封入体の形成が阻止されているとみられる MINO 濃度においても全体に多数の *C. trachomatis* 粒子が散在しており、しかも、その一部においては集合した粒子

が本来の封入体とまぎらわしくみられ (これを封入体様物質と称した)、封入体の有無が区別困難であった (Photo. 5, 下段左, 右)。

2. 各種抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力測定  
各種抗菌剤の *C. trachomatis* D/UW-3/Cx 株, L<sub>2</sub>/434/Bubo 株に対する抗菌力を系統別に測定して、MIC として表示した。

*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 株に対してテトラサイクリン系薬剤はいずれの薬剤も良好な抗菌力を示したが、その中で TC の MIC は 0.01  $\mu\text{g/ml}$  であり、最も良好な抗菌力を有していた。MINO がそれに次いでおり、DOXY では 0.04  $\mu\text{g/ml}$  であった。マクロライド系薬剤では EM の MIC は 0.08  $\mu\text{g/ml}$  と比較的良好的な抗菌力を示したが、マクロライド系類似薬剤である CLDM, LCM はそれぞれ 1.28  $\mu\text{g/ml}$ , 5.12  $\mu\text{g/ml}$  と抗菌力が弱かった。ピリドンカルボン酸系薬剤では OFLX の MIC

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial agents against *Chlamydia trachomatis* (D/UW-3/Cx or L<sub>2</sub>/434/Bubo)  
(Inoculum size:  $5 \times 10^3$  IFU/well)

Antimicrobial agents	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	D/UW-3/Cx	L <sub>2</sub> /434/Bubo
Tetracyclines		
TC	0.01	0.02
MINO	0.02	0.02
DOXY	0.04	0.01
Macrolides and its derivatives		
EM	0.08	0.08
MDM	0.32	0.08
JM	0.32	0.16
CLDM	1.28	0.64
LCM	5.12	20.48
Pyridone carboxylic acids		
OFLX	0.64	0.64
CPFX	5.12	1.28
ENX	5.12	1.28
NFLX	10.24	2.56
NA	81.92	20.48
Penicillins		
ABPC	>81.92	>81.92
PIPC	>81.92	>81.92
Cephems		
CMZ	>81.92	>81.92
CPZ	>81.92	>81.92
LMOX	>81.92	>81.92
Aminoglycosides		
TOB	>81.92	>81.92
GM	>81.92	>81.92
SM	>81.92	>81.92
Others		
RFP	0.08	0.04

が  $0.64 \mu\text{g/ml}$  であった以外は、CPFX, ENX ではいずれも  $5.12 \mu\text{g/ml}$ , NFLX では  $10.24 \mu\text{g/ml}$ , NA では  $81.92 \mu\text{g/ml}$  とかなり弱い抗菌力であった。 $\beta$ -ラクタム系薬剤, アミノグリコシド系薬剤の MIC はいずれも  $81.92 \mu\text{g/ml}$  以上であった。その他の抗菌剤として RFP の MIC は  $0.08 \mu\text{g/ml}$  と比較的良好な抗菌力を示した。

*C. trachomatis* L<sub>1</sub>/434/Bubo 株に対してテトラサイクリン系薬剤はやはりいずれの薬剤も良好な抗菌力を示したが、DOXY の MIC が  $0.01 \mu\text{g/ml}$  であり、最も良好な抗菌力を有しており、TC, MINO では  $0.02 \mu\text{g/ml}$  であった。マクロライド系薬剤では EM, MDM の MIC は  $0.08 \mu\text{g/ml}$  と比較的良好な抗菌力を示したが、CLDM, LCM はそれぞれ  $0.64 \mu\text{g/ml}$ ,  $20.48 \mu\text{g/ml}$  と抗菌力が弱かった。ピリドンカルボン酸系薬剤では OFLX の MIC が  $0.64 \mu\text{g/ml}$  であったが、NA では  $20.48 \mu\text{g/ml}$  とかなり弱い抗菌力であった。 $\beta$ -ラクタム系薬剤, アミノグリコシド系薬剤の MIC は DJUW-3/Cx 株の場合と同様にいずれも  $81.92 \mu\text{g/ml}$  以上であった。RFP の MIC は  $0.04 \mu\text{g/ml}$  と良好な抗菌力を示した (Table 2)。

### III. 考 察

*C. trachomatis* は人工培地で増殖しないため一般細菌と同様な MIC 測定法は不可能である。これまで本病原体の抗菌剤に対する *in vitro* での感受性測定法としては種々の方法<sup>1-10)</sup> が報告されているが、いずれの方法も煩雑で実用的ではない。また、*C. trachomatis* はその増殖サイクルにおいて EB と RB という2種の形態をとり、両者は抗菌剤に対する感受性が異なると考えられる。さらに、*C. trachomatis* 接種後、どの時期に抗菌剤を添加することが良いのかという点に関して検討されていなかった。それゆえ、抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力測定法は国内外ともに統一された方法がないのが現状である。

電顕を併用しつつ抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力測定法について検討した成績はこれまで全く報告されていない。今回、著者は直接蛍光染色法と電顕による観察を同時に施行することにより抗菌剤の添加時期について検討した。直接蛍光染色法と電顕を対比させた理由は、直接蛍光染色法による *C. trachomatis* 封入体の存在が、そのまま intact の *C. trachomatis* 粒子の集まりを意味するものではない可能性があると考えたからである。事実、*C. trachomatis* 接種 20 時間後から MINO  $0.16 \mu\text{g/ml}$  を作用させた時の成績がその可能性を実証した。*C. trachomatis* 接種直後に添加した場合には  $0.02 \mu\text{g/ml}$  の MINO 濃度で直接蛍光染色法により封入体の形成がみられなかったものが、接種 20 時間後から

MINO を添加した場合には培地にその3管濃い濃度の MINO を含んでいたにもかかわらず、直接蛍光染色法ではほぼ正常と思われる封入体のみがみられ、この濃度の MINO が一見無効と思われる成績を示した。しかし、この時にみられた封入体は直接蛍光染色法では単に小さいのみで intact の *C. trachomatis* 粒子を含んでいるものと思われたが、電顕による観察からはコントロールで48時間後にみられた封入体とは全く内部の異なった封入体で、感染性を有するとされる *C. trachomatis* EB は存在していないことが明らかとなった。そして、このことはさらに再接種の結果によっても裏付けられた。以上より、FITC 標識抗 *C. trachomatis* モノクローナル抗体を用いて直接蛍光染色法を施行した場合、*C. trachomatis* 粒子が正常形態をなしていなくとも外膜の抗原性は残存するため、intact の封入体とはほとんど区別し得ずに染色されてしまうことが判明した。したがって、抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力について論じる時に、抗菌剤の添加時期によっては同時に電顕による封入体内部の観察を併用することが必要となることがわかった。

抗菌剤の添加時期として今回、*C. trachomatis* が EB の状態にあると考えられる接種直後と、大部分が RB の状態になっていると考えられる接種 20 時間後の2通り行なったが、前者において 48 時間後に直接蛍光染色法と電顕により *C. trachomatis* 封入体の形成がみられない最小 MINO 濃度および再接種で *C. trachomatis* 封入体のみがみられない最小 MINO 濃度と、後者において電顕により *C. trachomatis* EB がみられない最小 MINO 濃度はいずれも一致していた。抗菌剤添加時期を *C. trachomatis* 接種 20 時間後とした場合には電顕を使用しない限り *C. trachomatis* EB の有無を確認できなかった。一方、抗菌剤添加時期を *C. trachomatis* 接種直後とした場合には電顕での *C. trachomatis* EB の有無、直接蛍光染色法での封入体の有無および再接種での *C. trachomatis* 封入体の有無とがいずれも一致しているため、電顕も使用せず、再接種もしくは直接蛍光染色法のみで間接的に *C. trachomatis* EB の有無がわかり、*C. trachomatis* EB がみられなくなる最小 MINO 濃度が簡便に測定可能であった。したがって、抗菌剤の添加時期を *C. trachomatis* 接種直後とした今回の MIC 測定法は、intact の *C. trachomatis* の EB の有無が直接蛍光染色法のみで簡便に区別し得ていることが電顕の併用により判明した。

今回、*C. trachomatis* の接種直後から 48 時間抗菌剤を作用させて封入体の形成が阻止される最小抗菌剤濃度を測定することにより抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力をみた。臨床、抗菌剤は 72 時間以上、通常



1~2週間にわたり継続的に投与される。したがって、抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力をみるにあたって72時間以上継続的に抗菌剤を作用させた方が、抗菌剤の臨床効果をより反映する結果が得られるものと考えられる。しかし、72時間ないしそれ以上 *C. trachomatis* の培養を続けた場合には封入体が破裂してしまい、的確に検出できなくなってしまう。それゆえ著者が用いた MIC 測定法は、抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力をみるにあたり妥当かつ実際的な方法と考えられた。

*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 標準株の接種量の検討においては、その接種量として  $5 \times 10^3$  IFU/well が封入体形成に対する抗菌剤の抑制が最も明確であり、これより少な過ぎても多過ぎても抗菌力測定法には適さないことがわかった。 $5 \times 10^4$  IFU/well 以上の高接種量でみられた封入体様物質は死滅した *C. trachomatis* 粒子そのものがやはり外膜の抗原性の残存により染色されてしまうことによるものと思われた。

RIDGWAY ら<sup>9)</sup>は *C. trachomatis* を接種後、抗菌剤を38~40時間作用させてから細胞ごと *C. trachomatis* を回収して、その後、抗菌剤を含まない培地で10代継代培養して封入体の形成がみられない最小抗菌剤濃度を Minimum cidal concentration (MCC) として抗菌剤の抗菌力を測定した。また、HEESSEN ら<sup>10)</sup>は *C. trachomatis* を接種後、抗菌剤を72時間作用させてから *C. trachomatis* を細胞ごと回収して、その後何回か抗菌剤を含まない培地で継代培養して封入体の形成がみられない最小抗菌剤濃度を Minimum lethal concentration (MLC) として抗菌力をみた。MCC、MLC はいずれも回収時点において感染性を有する EB が存在しているか否かをその後の継代によりみているに過ぎず、しかも、これらの測定は多大な労力と時間を要する。それに対して、今回著者が施行した MIC 測定法では intact の *C. trachomatis* EB の有無が1回の培養と直接蛍光染色法のみで簡便に区別し得るといふ利点を有していた。

加藤ら<sup>11)</sup>は単独培養チューブを使って *C. trachomatis* の臨床分離株の薬剤感受性を報告したが、彼らの方法では単独培養チューブを用いるので多大な労力を要する。また、臨床分離株では分離以前の治療その他の影響が種々加わり、標準株と比較して薬剤感受性が異なっている可能性があり得る。至適接種量に関しては、加藤らは直接蛍光染色を用いた場合、 $10^3 \sim 10^4$  IFU/coverslip が適切であったと報告しており、この点においては今回の成績とはほぼ一致する結果であった。

上記の検討成績から抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力測定に際しての条件が決定された。測定時の条

件としては *C. trachomatis* を  $5 \times 10^3$  IFU/well 接種して、接種直後に被験抗菌剤をそれぞれ最終濃度で 81.92  $\mu\text{g/ml}$  から 0.0025  $\mu\text{g/ml}$  まで2倍希釈系列で *C. trachomatis* 培養用 MEM 培地に添加し、直接蛍光染色により48時間後における *C. trachomatis* 封入体形成を阻止した最小抗菌剤濃度をみるのが最適とされた。そして、この濃度を MIC と規定し、抗菌剤の *C. trachomatis* に対する抗菌力を表わすものとした。

最終的に *C. trachomatis* D/UW-3/Cx 株および L<sub>2</sub>/434/Bubo 株の2種の標準株を用いて各種抗菌剤のMICを測定した。D株は *C. trachomatis* の15種の血清型の中でE株とともに最も分離頻度の高い株であり、trachoma biovar を代表させるものとして最も適切である。また、L<sub>2</sub>株は lymphogranuloma venereum biovar 中では最も分離頻度が高い<sup>12)</sup>。この2種の標準株に対する各種抗菌剤の MIC は各系統別におよそ似通っており、テトラサイクリン系薬剤とマクロライド系薬剤と RFP はいずれもが良好な抗菌力を有していた。また、最近めざましい研究開発がなされているピリドンカルボン酸系抗菌剤においては OFLX の MIC が D/UW-3/Cx 株でも、L<sub>2</sub>/434/Bubo 株でも 0.64  $\mu\text{g/ml}$  と比較的良好であることが注目された。斎藤ら<sup>13)</sup>は *C. trachomatis* による非淋菌性尿道炎に OFLX を使用して優れた臨床効果を得たことを報告しており、テトラサイクリン系薬剤、マクロライド系薬剤に加えて本剤の *C. trachomatis* 感染症に対する有用性が期待される。*C. trachomatis* D/UW-3/Cx 株、L<sub>2</sub>/434/Bubo 株の2つの標準株間では MIC はいずれも抗菌剤においても2管以内の差であり、しかも抗菌剤相互間の優劣の順については両者でほとんど差がなかった。

本論文の要旨は第60回日本感染症学会総会(昭和61年4月:於東京)および第34回日本化学療法学会総会(昭和61年6月:於倉敷)にて発表した。

〔謝辞〕 稿を終るにあたり本研究に直接御協力下さった川崎市立川崎病院長藤森一平博士、同内科小林芳夫博士ならびに富井正邦博士に謝意を表します。

また、御指導御校閲を賜った東邦大学医学部微生物学教室五島睦子教授に深く感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 小花光夫: *Chlamydia trachomatis* 感染症の診断法に関する検討。感染症学雑誌 59: 960~969, 1985
- 2) 小花光夫, 富井正邦, 小林芳夫, 藤森一平: 新生児および低月齢乳児における *Chlamydia trachomatis* 肺炎に関する検討。感染症学雑誌 59: 680~686, 1985

- 3) 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
- 4) RIDGWAY, G. L.; J. M. OWEN & J. D. ORIEL: The antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in cell culture. *Br. J. Vener. Dis.* 54: 103-106, 1978
- 5) HEESSEN, F. W. A. & H. L. MUYTJENS: *In vitro* activities of ciprofloxacin, norfloxacin, piperidic acid, cinoxacin, and nalidixic acid against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 123-124, 1984
- 6) BAILEY, J. M. G.; C. HEPPLESTON & S. J. RICHMOND: Comparison of the *in vitro* activities of ofloxacin and tetracycline against *Chlamydia trachomatis* as assessed by indirect immunofluorescence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 13-16, 1984
- 7) JOHANNISSON, G.; A. SERNYRD & E. LYCKE: Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Sex Transm. Dis.* 6: 50-57, 1979
- 8) HOBSON, D.; N. LEE, A. C. BUSHELL & N. WITHANA: The activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Chlamydia trachomatis* in Mc Coy cell cultures. *Chlamydial infections* (ed. MARDH, P. A., HOLMES, K. K., ORIEL, J. D., PIOT, P. & SCHACHTER, J.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982. pp. 249-252
- 9) MUYTJENS, H. L. & F. W. A. HEESSEN: *In vitro* activities of thirteen  $\beta$ -lactam antibiotics against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 520-521, 1982
- 10) 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, 鄭 漢彬: *Chlamydia trachomatis* の薬剤感受性 (第 1 報) Giemsa 染色と MicroTrak 法の比較。 *Chemotherapy* 33: 682-687, 1985
- 11) GRAYSTON, J. T. & S. P. WANG: New knowledge of chlamydiae and the diseases they cause. *J. Infect. Dis.* 132: 87-105, 1975
- 12) 齊藤 功, 寺田洋子, 國沢義隆: 非淋菌性尿道炎の治療, オフロキサシンの臨床効果の検討。 *泌尿科要* 32: 303-309, 1986

## STUDIES ON A METHOD FOR EVALUATING THE IN VITRO ACTIVITIES OF ANTIMICROBIAL AGENTS AGAINST *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

MITSUO OBANA

Department of Internal Medicine, Kawasaki Municipal Hospital

A method for determining the activities of antimicrobial agents against *Chlamydia trachomatis* was evaluated, because a standard method of this field has not been yet obtained.

The D/UW-3/Cx strain, one of the prototype strains of *C. trachomatis* was inoculated onto HeLa 229 cells and was cultured in 24-well dish at 37°C for 48 hours. The culture medium was MEM with 10% of fetal bovine serum and contained various concentrations of antimicrobial agents immediately after inoculation of *C. trachomatis*. The inclusion bodies were detected by the method of direct immunofluorescence staining, using FITC-labelled anti-*C. trachomatis* monoclonal antibody and were confirmed by electron microscopy in some cases. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of antimicrobial agent preventing the appearance of any inclusion bodies of *C. trachomatis*.

An optimum inoculum of *C. trachomatis* was  $5 \times 10^5$  inclusion forming units per well, because a larger dose of inoculum tended to see aggregation of the organisms, and a smaller dose resulted in a difficulty of observation.

The MICs of tetracycline, minocycline and erythromycin against D/UW-3/Cx strain of *C. trachomatis* were 0.01, 0.02 and 0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. The MIC of ofloxacin, a new pyridone carboxylic acid, was 0.64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

In conclusion, this method was useful for evaluating the susceptibility of *C. trachomatis* to antimicrobial agents.