

## *Chlamydia trachomatis* の抗菌薬感受性測定法に関する検討

佐藤 隆志・熊本 悦明・広瀬 崇典

恒川 琢司・林 謙 治

札幌医科大学泌尿器科教室\*

(主任：熊本悦明教授)

(平成2年4月27日受付・平成2年9月6日受理)

*C. trachomatis* の各種抗菌薬 (minocycline (MINO), doxycycline (DOXY), erythromycin (EM), clarithromycin (TE-031), ofloxacin (OFLX), ampicillin (ABPC)) に対する感受性測定を種々の条件で行った。

1. 培養細胞として、HeLa 229 細胞 (Wang と Flow Lab. 供与の 2 株) を使用した場合と、McCoy 細胞を使用した場合を比較検討したところ、MINO, DOXY, TE-031, OFLX, ABPC では、MIC に差は認められなかったが、EM の場合は Wang 供与の HeLa 229 細胞において、4~5 段階 MIC が低値であった。また、培養細胞としては、ヒト由来細胞であることから HeLa 229 細胞が適当であるが、使用細胞の由来を統一する必要があると考えられた。

2. 接種菌量による検討では、 $10^5$  IFU/well 接種時と、 $10^2$  IFU/well 接種時では、各抗菌薬ともに、 $10^5$  IFU/well の方が 1~2 段階高い MIC であった。また、 $10^4$  IFU/well 接種時が判定時に最も封入体の有無を鑑別しやすく、再現性にも富み、MIC 測定に適した接種菌量であった。

3. 染色法による比較では、MINO, DOXY, EM, TE-031, OFLX の MIC は、蛍光抗体法の方がヨード染色法に比較して、2~4 倍高かった。しかし、ABPC の MIC は、ヨード染色法で  $1.0 \mu\text{g/ml}$  であったが、蛍光抗体法では  $128 \mu\text{g/ml}$  以上と大きく異なっていた。このことより、蛍光抗体法がヨード染色法よりも特異性が優れ、さらにヨード染色法では検出不可能な抗菌薬の影響を受けた封入体も染色可能なため、MIC 測定に適していた。

以上より、*C. trachomatis* 抗菌薬感受性測定は、種々の条件により測定値が変動するため、今後は、日本化学療法学会より提案されたクラミジア薬剤感受性測定法標準法に基づき行われることが必要と考えられた。

**Key words** : *C. trachomatis*, 抗菌薬感受性

*Chlamydia trachomatis* (以下 *C. trachomatis*) は、非淋菌性尿道炎、副睾炎、子宮頸管炎、新生児肺炎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<sup>1)</sup>。本病原体は、偏性細胞寄生性であり、かつ一般細菌とは異なった独特な増殖サイクルを有する。そのため、*C. trachomatis* の抗菌薬に対する *in vitro* での感受性測定法に関しては、これまで統一した測定法がなく、各施設により、独自の方法で行われてきた<sup>2-15)</sup>。

このような状況をふまえ、日本化学療法学会においてクラミジア薬剤感受性測定法検討委員会 (委員長 熊本悦明) が設けられ、クラミジア MIC 測定法について詳細に検討された。そのまとめが日本での標準法として、1989 年 5 月の

日本化学療法学会総会において発表され、Chemotherapy 1989 年 12 月号に掲載されている<sup>16)</sup>。我々もこの委員会のメンバーとして標準法作成のための基礎的検討を行った。その基礎的検討の過程において、種々の測定条件による、MIC 値の変動について検討した。その結果をもとに、標準法の可否について検討したので報告する。

### 1. 材料と方法

#### 1. *C. trachomatis*

国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部から分与を受けた *C. trachomatis* 標準株 D 株 (D/UW-3/Cx strain) を使用した。

#### 2. 使用細胞

\*札幌市中央区南 1 条西 16 丁目

McCoy 細胞 (Flow Laboratories Inc., Virginia より入手) および 2 株の HeLa 229 細胞 (ワシントン大学 Wang 教授より入手したものと, Flow Laboratories Inc., Virginia より入手したものを) を用いた。

### 3. 使用抗菌薬

Minocycline (MINO: 日本レダリー株式会社), doxycycline (DOXY: ファイザー製薬), erythromycin (EM: 大日本製薬), clarithromycin (TE-031: 大正製薬), ofloxacin (OFLX: 第一製薬), ampicillin (ABPC: 明治製薬) の 6 種の抗菌薬について検討した。

MINO, DOXY, ABPC については, それぞれの原末を滅菌蒸留水に溶解して 1 mg/ml の標準液を作製し,  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結保存した。EM, TE-031 はメタノールに溶解した。OFLX については 0.1 規定 NaOH に溶解して, その後蒸留水で希釈して  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結保存した。これらを使用直前に融解し, 目的とする最大薬剤濃度の 20 倍濃度 (Master dilution) を作製した。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。

### 4. MIC 測定法

MIC 測定には, 24 穴細胞培養用 plastic plate (Falcon 社製) に直径 13mm の coverslip を入れたものを使用した。各 well に McCoy 細胞または HeLa 229 細

胞の monolayer を形成した後, SPG (sucrose-phosphate buffer glutamine acid) にて種々の感染力値に調整した *C. trachomatis* 接種液を 0.25 ml 接種した後, 室温,  $900\times g$  にて 1 時間遠心吸着を行い, 上清の接種液を除去した。各抗菌薬濃度 (Master dilution 法にて希釈) を含む培養液 (Eagles MEM + 5% FCS + 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cyclohexamide) を各 well に 1 ml ずつ分注し,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator にて 72 時間培養し, 封入体形成の有無を判定した。封入体の有無は FITC 標識抗 *C. trachomatis* モノクローナル抗体を用いた直接蛍光抗体法 (以下, 蛍光抗体法とする) およびヨード染色法を用いて判定した。蛍光抗体法は, 各 well の coverslip を PBS にて洗浄し, 99% エタノールで室温 10 分間固定した後, FITC 標識抗 *C. trachomatis* モノクローナル抗体を 30 分反応させる。洗浄乾燥後, 封入し蛍光顕微鏡にて観察した。

ヨード染色法は, Hanks 液で洗浄し, 99% メタノールで室温 10 分間固定した後, Jones のヨード液を添加し 30 分染色し, 光学顕微鏡にて観察した (Fig. 1)。

## II. 結 果

### 1. 使用細胞の違いによる MIC の比較検討

McCoy および HeLa 229 細胞 (2 株) を使用した時の各抗菌薬の *C. trachomatis* に対する MIC の測定結

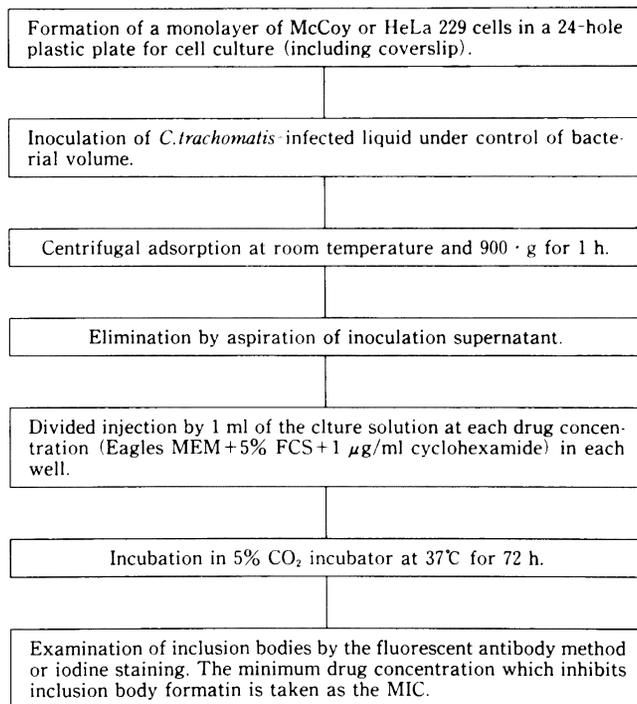


Fig. 1. Method of measuring *C. trachomatis* MICs

果を Table 1 に示す。

MINO, DOXY, TE-031, OFLX, ABPC では、使用細胞を変えても、MIC は同値か、もしくは測定誤差範囲と考えられる 1 段階以内の変動であった。しかし、EM に関しては使用細胞により MIC が明らかに異なり、4 段階の差を認め、Wang よりの HeLa 229 細胞において他の 2 細胞より MIC が低値であった。

## 2. 接種菌量の違いによる MIC の比較検討

$10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  IFU/well となるよう調整した *C. trachomatis* を HeLa 229 細胞 (Flow Lab.) に接種した際の MIC の測定結果を Table 2 に示す。

各抗菌薬とも  $10^3$  IFU/well,  $10^4$  IFU/well では MIC に差は認められなかったが  $10^2$  IFU/well と  $10^5$

IFU/well との比較では、 $10^5$  IFU/well の方が MIC は 1~2 段階高くなった。

## 3. 判定法の違いによる MIC の比較検討

$10^4$  IFU/well の *C. trachomatis* を HeLa 229 細胞 (Flow Lab.) に接種し、ヨード染色法および蛍光抗体法で判定した時の MIC の測定結果を Table 3 に示す。

ABPC 以外の薬剤では、ヨード染色法よりも蛍光抗体法が 1~2 段階 MIC が高かった。しかし、ABPC では、ヨード染色法では  $1.0 \mu\text{g/ml}$  であったのに対して、蛍光抗体法では  $128 \mu\text{g/ml}$  以上と大きく異なった MIC を示した。

## III. 考 察

*C. trachomatis* は、特種な増殖サイクルを有するた

Table 1. MICs against *C. trachomatis* D strain using McCoy cells and HeLa 229 cells (2 cell lines)

|                | McCoy  | HeLa 229<br>(Flow Lab.) | HeLa 229<br>(Prof. Wang) |
|----------------|--------|-------------------------|--------------------------|
| Minocycline    | 0.031  | 0.063                   | 0.063                    |
| Doxycycline    | 0.063  | 0.031                   | 0.063                    |
| Erythromycin   | 0.5    | 0.5                     | 0.031                    |
| Clarithromycin | 0.008  | 0.016                   | 0.008                    |
| Ofloxacin      | 1.0    | 1.0                     | 0.5                      |
| Ampicillin     | >128.0 | >128.0                  | >128.0                   |

Inoculum size:  $10^4$  IFU/well

( $\mu\text{g/ml}$ )

Stained by fluorescent antibody method

Table 2. Effect of inoculum size on MICs against *C. trachomatis* D strain

|                | $10^2$ | $10^3$ | $10^4$ | $10^5$ | (IFU/well) |
|----------------|--------|--------|--------|--------|------------|
| Minocycline    | 0.031  | 0.063  | 0.063  | 0.125  |            |
| Doxycycline    | 0.031  | 0.063  | 0.063  | 0.125  |            |
| Erythromycin   | 0.25   | 0.5    | 0.5    | 1.0    |            |
| Clarithromycin | 0.004  | 0.008  | 0.008  | 0.016  |            |
| Ofloxacin      | 0.5    | 1.0    | 1.0    | 2.0    |            |
| Ampicillin     | >128   | >128   | >128   | >128   |            |

HeLa 229 cells (Flow Lab.) were used as culture cells

( $\mu\text{g/ml}$ )

Stained by fluorescent antibody method

Table 3. MICs against *C. trachomatis* D strain stained by iodine staining and fluorescent antibody methods

|                | Iodine staining | Fluorescent antibody |
|----------------|-----------------|----------------------|
| Minocycline    | 0.016           | 0.063                |
| Doxycycline    | 0.016           | 0.031                |
| Erythromycin   | 0.125           | 0.5                  |
| Clarithromycin | 0.004           | 0.008                |
| Ofloxacin      | 0.5             | 1.0                  |
| Ampicillin     | 1.0             | >128                 |

Inoculum size:  $10^4$  IFU/well( $\mu\text{g/ml}$ )

HeLa 229 cells (Flow Lab.) were used as culture cells

め、一般細菌と同様な抗菌薬感受性測定はできない。これまで、本病原体の抗菌薬に対する *in vitro* での感受性測定法としては種々の方法が報告<sup>2-15)</sup>されているが、施設により、その測定結果にかなりの差が認められる。

今回、我々は *C. trachomatis* の MIC 測定を、測定条件を変えて行い、その測定結果におよぼす影響について検討し、さらにクラミジア MIC 測定に適した判定条件について考察を加えた。

初めに、使用細胞についてであるが、McCoy 細胞および HeLa 229 細胞はともに *C. trachomatis* の培養および MIC 測定によく用いられる<sup>17-19)</sup>。McCoy 細胞は、1963 年 Gordon ら<sup>20)</sup>が、それまで行われていた発育鶏卵培養法との比較により、*C. trachomatis* の分離培養に有用であることを報告して以来、主にヨーロッパを中心に使用されてきた。この細胞は、維持が比較的容易であり、さらに passage する時に分散しやすいため monolayer を作りやすい。

一方、HeLa 229 細胞は主にアメリカ合衆国を中心に使用されており、細胞を維持することが McCoy 細胞に比べるとやや難しいが、*C. trachomatis*、*C. psittaci* のいずれに対しても感受性が高い。

今回の成績では、MINO, DOXY, TE-031, OFLX, ABPC の MIC は、McCoy 細胞使用時と、HeLa 229 細胞使用時で差を認めなかった。しかし、EM に関しては、使用細胞の違いにより、Wang 供与の HeLa 229 細胞において 4 段階低値を示した。これは、使用細胞により、EM の細胞内への取り込み能に差があるためと推察されるが、吉沢ら<sup>21)</sup>も EM の *C.*

*trachomatis* に対する MIC は、McCoy 細胞使用時の方が HeLa 229 細胞使用時よりも、5~7 倍高いと報告している。EM 以外にも使用細胞により異なった MIC を示す抗菌薬が存在する可能性は否定できないため、MIC 測定の際には使用細胞の統一が必要と考えられた。

ところで、*C. trachomatis* に対する感受性は、McCoy、HeLa 229 細胞ともに良好である。しかし、*C. psittaci* および *C. pneumoniae* に関しては、HeLa 229 細胞の方が感受性が高いと考えられる。さらに、HeLa 229 細胞はヒト由来細胞、McCoy 細胞はマウス繊維芽細胞であることを考慮すると、ヒトを対象とする抗菌薬の薬効判定には、HeLa 229 細胞を使用した方がより適当と考えられる。

次に接種菌量が MIC 値におよぼす影響についてであるが、一般細菌と同様に *C. trachomatis* においても接種菌量により MIC が変化することが充分考えられる。

接種菌量を変化させた測定結果では、各抗菌薬とも、 $10^3$  IFU/well と  $10^4$  IFU/well では MIC に差を認めなかったが、 $10^2$  IFU/well と  $10^5$  IFU/well の比較では、 $10^5$  IFU/well の方が 1~2 段階ほど高い MIC を示した。接種菌量が多ければ、封入体の発育を抑制するための抗菌薬がより高濃度必要となり、MIC が高くなるために、接種菌量を統一する必要があると考えられた。

永山ら<sup>13)</sup>は、 $5 \times 10^2$ 、 $2 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$  IFU/well の接種菌量で比較検討したところ、 $1 \times 10^4$  IFU/well 接種時が最も良好な結果が得られたと報告

している。また、小花<sup>14)</sup>は、 $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$  IFU/well の接種菌量で比較検討したところ、 $5 \times 10^3$  が最も適切な接種菌量であったと述べている。今回、 $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  IFU/well の接種菌量で検討したが、 $10^2 \sim 10^3$  IFU/well では、一視野あたりの封入体数が少なく、封入体が消失する濃度の判定が困難であった。また、 $10^5$  IFU/well では、蛍光抗体法で判定する時に、細胞外に、残存するクラミジア粒子が多数観察され、細胞質内に形成された封入体との鑑別が困難であった。ところが、 $10^4$  IFU/well 接種した時は、全細胞の約 20~30% 程度が感染し、封入体が消失する濃度の判定が最も容易で、かつ細胞外残存クラミジア粒子数もすくなく、そのため封入体と残存クラミジアの識別が容易となった。したがって、 $10^4$  IFU/well が最も適切な接種菌量であると考えられた。

最後に染色法の違いによる検討であるが、C. trachomatis の染色には、従来 Giemsa 染色法、ヨード染色法、蛍光抗体法などが用いられる。

Giemsa 染色法は、手技は簡便であるが、封入体の検出感度は、ヨード染色法、蛍光抗体法に比べ最も低い<sup>11,22)</sup>。

ヨード染色法では C. trachomatis の代謝過程でグリコーゲンが蓄積することにより、それが染色され封入体として検出される。操作も簡便で検出感度も比較的良好であるが、C. trachomatis の増殖サイクルのある時期以降でしかグリコーゲン陽性とならないため、薬剤存在下で封入体が形成されても代謝活性が抑制された状態では必ずしも正常な増殖におけるグリコーゲンの蓄積が起らず、その結果陰性となることがある。さらに、HeLa 229 細胞を使用した場合、HeLa 229 細胞には endogenous ヨード陽性小体が存在し、封入体との識別が難しいなどの欠点がある。

蛍光抗体法は特異性の点からは、最も優れており、さらに検出感度も高い。Stephens ら<sup>22)</sup>は細胞培養法における封入体の検出感度を蛍光抗体法と Giemsa 染色法で比較し、有意に蛍光抗体法が優れていたと報告している。また、加藤ら<sup>11)</sup>も MIC 測定の際に Giemsa 染色法と蛍光抗体法による染色を比較しているが、蛍光抗体法で測定した MIC は、Giemsa 染色法による値よりも 2~3 倍高いと報告している。

今回は、ヨード染色法と蛍光抗体法で比較検討した。MINO, DOXY, EM, TE-031, OFLX では、ヨード染色法よりも蛍光抗体法の方が 2~4 段階高い MIC 値を示した。

ABPC では、ヨード染色法で  $1.0 \mu\text{g/ml}$  であったのに対して、蛍光抗体法で  $128 \mu\text{g/ml}$  以上であり、大き

く異なった値を示した。ABPC などの  $\beta$ -ラクタム剤 (細胞壁合成阻害剤) は、elemental bodies (EB) の細胞への吸着、侵入や reticulate bodies (RB) への転換に対してはまったく影響を与えないが、RB の分裂を抑制するため、巨大な RB が形成される<sup>23,24)</sup>。さらに、同時にこの巨大 RB を含む封入体内は、グリコーゲンの蓄積が起らないために、ヨード染色法では染色されないが、この RB も抗原性を有しているために蛍光抗体法では染色されるためと考えられた。Bailey ら<sup>6)</sup>は、蛍光抗体法によるとこのような  $\beta$ -ラクタム剤存在下で形成される異常 RB を含む封入体も染色できるため、今後蛍光抗体法による染色が世界的にも主流になることを予測し報告している。今回の検討でも、蛍光抗体法が最も検出感度が高く、かつヨード染色法では染色されない抗菌薬の影響を受けた封入体も染色されることが証明され、Bailey らの予測が裏づけられた。

今回、C. trachomatis の抗菌薬感受性測定を種々の条件のもとで行ったか、その測定値は、測定条件により変化することが証明された。同時に日本化学療法学会のクラミジア薬剤感受性測定法検討委員会により提案された標準法の妥当性が証明されたので、今後この標準法に基づいて、抗菌薬感受性測定が行われる必要があると考えられた。

#### 文 献

- 1) Tayler Robinson D & B, Thomas J: The role of *Chlamydia trachomatis* in genitaltract and associated disease. J. Clin. Pathology 33: 205~233, 1980
- 2) Kuo C C, Wang S P, Grayston J T: Antimicrobial Activity of Several Antibiotics and a Sulfonamide Against *Chlamydia trachomatis* Organisms in Cell Culture. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 12: 80~83, 1977
- 3) Lee C K, Bowie W R, Alexander E R: *In Vitro* Assays of the Efficacy of Antimicrobial Agents in Controlling *Chlamydia trachomatis* Propagen. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 13: 441~445, 1978
- 4) Muyltjens H L, Hessen F W A: *In Vitro* Activities of Thirteen  $\beta$ -Lactam Antibiotics Against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 22: 520~521, 1982
- 5) Hammerschlag M R, Gleyzer A: *In Vitro* Activity of a Group of Broad-Spectrum Cephalosporins and Other  $\beta$ -Lactam Antibiotics Against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 23: 493~494, 1983
- 6) Bailey J M G, Heppleston C, Richmond S J: Comparison of the *In Vitro* Activities of Ofloxacin and Tetracycline Against *Chlamydia tra-*

- chomatis* as Assessed by Indirect Immunofluorescence. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 26: 13~16, 1984
- 7) Hessen F W A, Muyltjens H I: *In Vitro* Activities of Ciprofloxacin, Norfloxacin, Pipemidic Acid, Cinoxacin, and Nalidixic Acid Against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrobial Agent and Chemotherapy 25: 123~124, 1984
  - 8) Bowie W R: *In Vitro* Activity of Clavulanic Acid, Amoxicillin, and Ticareillin against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 29: 713~715, 1986
  - 9) Stamm W E, Suchland R: Antimicrobial Activity of U 70138F (Paldimycin), Roxithromycin (RU 965) and Ofloxacin against *Chlamydia trachomatis* in Cell Culture. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 30: 806~807, 1986
  - 10) Kuo C C, Grayston J T: *In Vitro* Drug Susceptibility of *Chlamydia* sp. Strain TWAR. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 32: 257~258, 1988
  - 11) Nagayama A, Nakao T, Taen H: *In Vitro* Activities of Ofloxacin and Four Other New Quinolono-Carboxylic Acids against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 32: 1735~1737, 1988
  - 12) 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, 他: *Chlamydia trachomatis* の薬剤感受性 (第一報) Giemsa 染色と Microtrak 法の比較。Chemotherapy 33: 682~687, 1985
  - 13) 坂内久一, 宮沢 博, 芦原義守: 間接免疫ペルオキシダーゼ染色を用いた各種抗生剤の抗 *Chlamydia trachomatis* 効果測定。感染症学雑誌 60: 1140~1145, 1986
  - 14) 永山在明, 田縁晴子, 中尾偕主, 熊澤浄一: キノリンカルボン酸系抗菌剤の *Chlamydia trachomatis* に対する *in vitro* 抗菌力。西日本泌尿器科 49: 537~541, 1987
  - 15) 小井光夫: *Chlamydia trachomatis* の抗菌剤に対する *in vitro* 感受性測定法に関する研究。Chemotherapy 35: 283~292, 1987
  - 16) クラミジア薬剤感受性測定法検討委員会 (委員長 熊本 悦明): クラミジア薬剤感受性測定マニュアル。Chemotherapy 37: 1303~1313, 1989
  - 17) Scherer W F, Syverton J T, Gey G O: Studies on propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. VI. Viral multiplication in stable strain of human malignant epithelial cells (strain He-La) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J. Exp. Med., 97: 695~709, 1953
  - 18) Jenkin H M: The continuous passage of agents of trachoma in cell culture. J. Exp. Med. 97: 695~709, 1953
  - 19) Kuo C C, Wang S P, Wentworth B B, Grayston J T: Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE dextran. J. infect. dis. 125: 665~668, 1972
  - 20) Gordon F B, Happer I A, Quan A L, Arm H G: Cell culture for detection of trachoma virus from experimental simian infections. P. S. E. B. M. 112: 236~242, 1963
  - 21) 吉沢花子, 橋爪 壯: 組織培養法および動物系を用いた TE-031 の抗クラミジア活性と他薬剤との比較。Chemotherapy 36: 117~122, 1988
  - 22) Stephens R S, Kuo C C, Milton R T: Sensitivity of Immunofluorescence with Monoclonal Antibodies for Detection of *Chlamydia trachomatis* Inclusions in Cell Culture: J. of Clinical Microbiology 16: 4~7, 1982
  - 23) Tamura A, Manire G P: Effect of penicillin on the multiplication of meningopneumonitis organisms (*Chlamydia psittaci*). J. Bacterio. 96: 875~880, 1968
  - 24) Matsumoto A, Manire G P: Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. J. Bacterio. 101: 278~285, 1970

METHOD FOR EVALUATING *IN VITRO* ACTIVITY OF ANTIBACTERIAL AGENTS AGAINST *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Takashi Sato, Yoshiaki Kumamoto, Takaoki Hirose,  
Takuji Tsunekawa and Kenji Hayashi

Department of Urology (Director: Prof. Y. Kumamoto), Sapporo Medical College, Sapporo, Japan

We tested the sensitivity of *C. trachomatis* to various kinds of antimicrobial agents (minocycline (MINO), doxycycline (DOXY), erythromycin (EM), TE-031, ofloxacin (OFLX), ampicillin (ABPC)) under various conditions.

1) Comparison of HeLa 229 cells (2 different strains supplied by S.P.Wang, Univ. Washington, Seattle, USA and Flow Lab.) and McCoy cells used as culture cells revealed no differences in MIC, except that the MICs for EM were lower 4–5 stages in the case of the HeLa 229 cells supplied from Wang. We consider HeLa 229 cells suitable as culture cells for MIC determination because they are human origin, but that the use of HeLa 229 cells of one origin needs to be agreed upon.

2) Examination of inoculum titers revealed higher MICs (1–2 stages) for all drugs at  $10^8$  IFU/well than at  $10^2$  IFU/well, but was most easily determined and highly reproducible at  $10^4$  IFU/well, indicating that this is an appropriate inoculum titer for the determination of MIC.

3) Comparison of staining methods revealed higher MICs (2–4 times) for MINO, DOXY, EM, TE-031 and OFLX by the direct fluorescent antibody method (DFA) than by iodine staining, but a great difference in MICs for ABPC (128  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by the DFA as 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for the iodine staining). This suggests that the DFA had not only higher specificity to inclusion bodies, but also higher sensitivity to those drug-affected inclusion bodies undetectable by iodine staining.

Our results indicate that drug sensitivity tests of *C. trachomatis* should be performed on according to the standard method for determining drug sensitivity of *Chlamydia*, proposed by the Japanese Society of Chemotherapy, since results vary considerably according to the test conditions.