

## クラミジア MIC 測定法

—日本化学療法学会標準法—

(1991年改訂版)

### 〈クラミジア MIC 測定法マニュアル〉

〈原理〉：被験クラミジアを接種した HeLa 229 細胞を薬剤存在下で培養し，封入体形成抑制を示す最小薬剤濃度を検定する。

〈クラミジア取扱い上の注意〉：クラミジアは実験室内感染を起こす可能性がある。特に *C. psittaci* は危険度 3 に指定され，その取扱いは 2 重ドア，陰圧室内に設置した安全キャビネット内で行なうことが義務付けられている。*C. trachomatis* については安全キャビネットのみで取扱うことができるが，いずれにおいても汚染器具類，廃液等は原則としてオートクレーブ滅菌を要する。クラミジア浮遊液を取扱う際に，ピペットを口で吸引することは以上のバイオハザードの観点から絶対に行なってはならない。

- 1) MIC 測定には 24 穴細胞培養用 plastic plate を用いる。
- 2)  $1.5 \sim 2.0 \times 10^5$ /ml の HeLa 229 細胞を含む培養液 [Eagle's, MEM+熱非働化牛胎児血清 (FCS)] を plate の各 well (直径 14 mm のカバーガラスを予め入れておく) に 1 ml ずつ分注する。
  - ① HeLa 229 細胞の使用に関しては<附記 A. 1. a.>参照
  - ② HeLa 229 細胞の維持使用法に関しては<附記 A. 1. b.>参照
  - ③ Eagle MEM に関しては<附記 A. 2. a.>参照
  - ④ 熱非働化牛胎児血清 (FCS) に関しては<附記 A. 2. b.>参照
- 3) 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator で 24 時間培養して confluent monolayer の形成を確認後，培養液を吸引除去する。原則的にクラミジア接種前の DEAE-dextran 処理は行なわない。
  - ① DEAE-dextran の使用に関しては<附記 A. 3.>参照
- 4) 各 well に  $10^4$  IFU/well ( $4 \times 10^4$  IFU/ml, 0.25 ml) の検討すべきクラミジア株を接種する。なお当委員会にて決定した reference strain も同時に接種し，測定法に誤りが無いことを確認することが望ましい。
  - ① 接種菌量に関しては<附記 A. 4. および A. 5.>参照
  - ② Reference strain に関しては<附記 A. 6.>参照
- 5) 室温 500~900×g にて 1 時間遠心吸着を行なう<sup>1)</sup>。
- 6) 上清を吸引除去する。
- 7) 各薬剤濃度 (Master dilution 法にて希釈) を含む培養液 (Eagle's MEM+熱非働化 FCS+終末 1 μg/ml Cycloheximide) を各 well に 1 ml ずつ分注する。
  - ① Master dilution 法に関しては<附記 A. 7. a.>参照
  - ② 薬剤濃度の上限に関しては<附記 A. 7. b.>参照
  - ③ 薬剤濃度の表示法に関しては<附記 A. 7. c.>参照
  - ④ Cycloheximide に関しては<附記 A. 7. d.>参照
- 8) 下記の条件にて培養する。
  - [*C. trachomatis* 培養条件]: 37°C (±1°Cは許容範囲), 5%CO<sub>2</sub> incubator にて 72 時間培養し判定する。
  - [*C. psittaci* 培養条件]: 37°C (±1°Cは許容範囲), 5%CO<sub>2</sub> incubator にて 48 時間培養し判定する。
  - C. psittaci* は *C. trachomatis* に比べ，増殖が速い。
  - [*C. pneumoniae* (TWAR) 関連株培養条件]
    - : 35°C (±1°Cは許容範囲), 5% CO<sub>2</sub> incubator にて 72 時間培養し判定する。
  - ① 温度条件に関しては<附記 A. 8.>を参照
- 9) 培養液を吸引後，IF 法にて染色判定する。

- ① IF 法の使用に関しては<附記 A. 9. a.>参照
- 10) 100 倍を判定倍率とし蛍光顕微鏡にて全視野を観察する。封入体がまったく認められないものを陰性と判定し、封入体形成を抑制した最小薬剤濃度を MIC とする。

① 観察倍率に関しては<附記 A. 9. b.>参照

### <附 記 (A)>

#### 1. 使用細胞

##### a. 使用細胞の種類

HeLa 229 細胞を使用する。HeLa 229 細胞, McCoy 細胞いずれも良く使われているが<sup>2-5)</sup>, HeLa 229 細胞は人由来細胞株であるところから, これを用いた data は国際的により通用するものと考えられる。また, *C. psittaci* および *C. pneumoniae* (TWAR) 関連株では McCoy 細胞より HeLa 229 細胞のほうが感受性が高いと考えられる。以上の様な理由により HeLa 229 細胞を使用することにする。

なお, HeLa 229 細胞は国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部 (山崎修道部長) の保存株を使用することにする (連絡先: 〒190-12 東京都武蔵村山市学園 4-7-1 Tel. 0425-61-0771)。

##### b. HeLa 229 細胞の継代法

3~4 日間隔で継代する (1/3~1/4 に希釈し継代する時には 3 日~4 日で confluent になる)。もし発育速度の悪い時は *Mycoplasma* の contamination の可能性があるため, マイコプラズマ除去剤 MC 210 (大日本製薬) を説明書に従って培養液に加え, 2~3 代継代し, *Mycoplasma* を除去する。

細胞を長期保存する場合は凍結保存する。その凍結保存細胞を使用する場合は, 少なくとも 2 回以上継代の後使用する。

#### 2. 培養液

##### a. MEM

HeLa 229 細胞には, Eagle's MEM が適している。

##### b. 熱非働化牛胎児血清 (Fetal calf serum)

使用する牛胎児血清 (FCS) は熱非働化して用いる。メーカーによるよりも lot によるバラツキがあるので, この点を留意して使用する。濃度は細胞継代には 10% FCS, MIC 測定時の FCS 濃度は *C. psittaci* 5%, *C. trachomatis* 8%, *C. pneumoniae* (TWAR) 関連株は 10% を使用する<sup>6)</sup> (*Chlamydia* の growth rate の遅いもの程 FCS 濃度を上げる)。

#### 3. DEAE-dextran

細胞が傷み, 操作が繁雑になるため, 原則的に使用しない。しかし, 標準株と比較して MIC が 2 管以上異なった場合, ならびに *C. pneumoniae* (TWAR) 関連株などの特殊な場合には使用する。

#### 4. 接種菌量 (感染力価)

*C. trachomatis* 分離株は, HeLa 229 細胞にて感染増殖させ, 十分に封入体が観察できた時点で, 培地を除去後, 等量の SPG (次項参照) を加えラバーポリスマンにて感染細胞を剝離する。超音波などにてその感染細胞からクラミジアを遊離させた上, 500~900×g にて 5 分遠心する。その上清を *C. trachomatis* 浮遊液とする。*C. psittaci* 浮遊液も同様に調整する。作成した浮遊液は -70°C 以下にて凍結保存し, 使用時に解凍する。

*C. trachomatis*, *C. psittaci* いずれも接種時の濃度が高すぎる ( $10^6$  IFU/well 以上) とクラミジアの immediate toxicity<sup>7,8)</sup> により細胞に損傷を与え, 感染率もそれほど上がらない。また低すぎる ( $10^2$  IEU/well 以下) と封入体数が少なく判定が困難である。 $10^4$  IEU/well が適当な接種量である<sup>9)</sup>。接種菌液の容量は吸着時に乾燥しないように 0.25 ml ( $4 \times 10^4$  IFU/ml) とする。

#### 5. IFU (inclusion forming unit) の測定法

##### a. 原理

confluent monolayer の HeLa 229 細胞に段階希釈した一定量のクラミジア浮遊液を接種, 培養の後, 生じた封入体数を測定して, 封入体数, 接種量, 希釈倍数から単位浮遊液量当りの封入体形成単位, すなわち IFU を算定する。

## b. 方法

- ① 未知感染力価のクラミジア浮遊液の10倍段階希釈系列を以下の方法に従って準備する。
- i) 増殖培養した感染2～3日後の感染細胞から培地を除去する。
  - ii) 適量のSPGを加え、ラバーポリスマンにて細胞をかき取り、感染細胞浮遊液として集める(24穴プレート使用の場合にはSPG約1 ml/wellが適量である)。  
SPG (sucrose-phosphate-glutamic acid medium) は以下の処方により調整する。  
sucrose 37.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.26 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.7645 g, glutamic acid 0.36 g を蒸留水 500 ml に溶解後、 $0.2\ \mu\text{m}\phi$  メンブランフィルターにて濾過滅菌する(ストレプトマイシンまたはカナマイシン、およびバンコマイシンを各終末100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  加えるとよい)。
  - iii) 超音波(15～20秒でよい)などにて感染細胞からクラミジアを放出させ、 $500\sim 900\times 8$ にて5分遠心し、上清をクラミジア浮遊液の原液とする。
  - iv) 原液をもとに1～2 ml単位でSPGを用いて10倍希釈系列を作る。希釈は $10^{-8}\sim 10^{-9}$ までで充分である。原液や希釈系列は水中に保存する。
- ② マニュアル1)～3)に従って準備したconfluentのHeLa 229細胞に各希釈液0.25 mlを接種する。同一希釈液を4穴に接種し、封入体数を4穴の平均値として算出することが望ましい。したがって、実際に用いる希釈液は $10^{-3}\sim 10^{-8}$ の6段階である。残りの原液は $-70^\circ\text{C}$ 以下に凍結保存し、使用に際して軽く超音波処理後、実測して求めたIFUに合せてSPGにて希釈後、感染に用いる。
- ③ 吸着、培養、封入体の染色、観察はすべてマニュアル4)～9)に従って実施する。封入体数はカバーガラス全域について測定し、封入体数測定可能な希釈液の間、例えば $10^{-5}$ と $10^{-8}$ の間で4穴の平均値がほぼ10倍の違いがあれば力価測定値は良好と断定できる。下表のごとく、多少のズレがあっても異なった希釈度間で平均値を求めて、原液のIFU値を算定し、これをもとに $10^4$  IFU/wellになる希釈倍数を求めても、MIC値に影響を及ぼすことはほとんどない。

IFU (*C. trachomatis* D株)の算定例

| 希釈倍数      | 封入体実測数             | 平均値/well | 原液のIFU/ml        |                          |
|-----------|--------------------|----------|------------------|--------------------------|
| $10^{-3}$ | 112, 118, 101, 125 | 114      | $4.6\times 10^7$ | $\approx 4.4\times 10^7$ |
| $10^{-6}$ | 12, 10, 8, 11      | 10.3     | $4.1\times 10^7$ |                          |

この値の原液ならSPGにて1,100倍に希釈し、その0.25 ml/wellを接種してMIC測定に用いる。

なお、臨床分離株のMICを測定する場合は可能な限り継代数の少ない株について測定することが望ましい。このため増菌培養に際しては接種材料を希釈し過ぎないように配慮する必要がある。

## 6. Reference strain

臨床分離株の測定に際してはreference strainを同時に使用してMIC測定法の正確性の確認をすることが望ましい。

なお報告に際してはreference strainに対する薬剤のMICも附記する。

Reference strainとしては、*C. trachomatis*ではD/UW-3Cx株、*C. psittaci*ではBudgerigar No.1株を用いる。いずれも国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部より分与を受ける(連絡先は<附記A. 1. a.>に準ずる)。

## 7. 薬剤希釈

## a. 薬剤希釈法

薬剤の希釈法の違いにて薬剤濃度の違いが生じ、MICに影響を与える可能性がある。特に少量の溶液にて希釈系列を作製した場合、または2倍希釈を何度も繰返し施行した場合、その誤差は大きくなる。したがって、下記の方法にて実施する。

各薬剤に関し、目的とする最大薬剤濃度の20倍を蒸留水など(各薬剤により指定された溶液)にて作製し(Master dilution)、使用時にはmedium 9 mlに20倍濃度薬剤液1 mlを加え、10 mlの2倍濃度溶液とする。その後5 ml単位でピペットを使用し、2倍希釈系列を作製するのが望ましい。2倍希釈は6回までに留める。

## b. 薬剤濃度の上限

$\beta$ -lactam 系薬剤などの高 MIC 薬剤では高濃度にて封入体が観察されるので 128  $\mu\text{g/ml}$  まで測定して打切る。

## c. 薬剤濃度の表示

1  $\mu\text{g/ml}$  を基準とし、濃度表示は下記のごとくにする。

例: 0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128.0 ( $\mu\text{g/ml}$ )

d. Cycloheximide<sup>4)</sup>

*Chlamydia* 増殖は宿主細胞の蛋白合成を阻害すると増強され、封入体が観察され易くなる。したがって、MIC 測定に際しては終末 1  $\mu\text{g/ml}$  の cycloheximide を加える。

## ◎ Cycloheximide 原液の処方

グルコース 5.4 mg, cycloheximide 10 mg を蒸留水 100 ml に溶解後、0.2  $\mu\text{m}\phi$  フィルターにて濾過滅菌、4°C に保存する。使用に際して培地の 1/100 量を加える。

## 8. 温度条件

Incubation 温度が高くなると成績に著しい影響を及ぼすので温度条件は厳守すること。

なお *C. pneumoniae* (TWAR) 関連株は一般に他のクラミジアより発育速度は遅いが、37°C と 35°C の培養後の感染力価を比較すると 35°C 培養の感染力価が 37°C 培養のそれに比べて有意に高い<sup>4)</sup>。これは *C. pneumoniae* (TWAR) の生物学的特性と考えられる。したがって *C. pneumoniae* (TWAR) の関連株の MIC 測定時には 35°C  $\pm$  1°C を培養温度とする。

## 9. 測定法

## a. 染色法

MIC の判定には IF 法 [MicroTrak<sup>®</sup> は *C. trachomatis* のみ、オーソクラミジア (FA), Culture set<sup>®</sup> は *C. trachomatis*, *C. psittaci*, および *C. pneumoniae* (TWAR) 関連株の染色に使用可能] で行なうこととする。カバーガラスを取り出し、エタノールにて室温 15 分間固定、乾燥後遮光して染色する。ただちに染色できない場合は、固定乾燥後、-20°C に保存できる。

HeLa 229 細胞は細胞質内にヨード陽性小体が存在し、封入体と混同される可能性があるためヨード法は HeLa 229 細胞を用いる封入体観察には適さない。

## b. 観察倍率

変形した microinclusion は、400~1,000 倍の高倍率で見ると少数が数段階にわたり残存するので消失判定が困難である。そこで変形した microinclusion が比較の見えにくい 100 倍にて観察する。

## &lt;参考資料&gt;

Reference strain に対する当委員会の MIC 測定成績は次のごとくである。

|      | <i>C. trachomatis</i><br>D/UW-3/Cx | <i>C. psittaci</i><br>Budgerigar No.1 | <i>C. pneumoniae</i><br>TW-183   |
|------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| MINO | 0.016~0.063 ( $\mu\text{g/ml}$ )   | 0.016~0.063 ( $\mu\text{g/ml}$ )      | 0.016~0.031 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
| DOXY | 0.031~0.063                        | 0.016~0.063                           | 0.031~0.063                      |
| EM   | 0.125~0.5                          | 0.25 ~0.5                             | 0.25 ~0.5                        |
| CAM  | 0.008~0.031                        | 0.008~0.031                           | 0.008~0.031                      |
| OFLX | 0.25 ~1.0                          | 0.25 ~1.0                             | 0.5 ~1.0                         |
| ABPC | 128<                               | 128<                                  | 128<                             |

## &lt;参考文献&gt;

- 1) Darougar S, Kinnison J R, Jones B R: Simplified irradiated McCoy cell culture for isolation *Chlamydiae*; in

- Nichols Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents. *Excerpta med. Int. Congr. Series* No. 223, pp. 63~70, 1971
- 2) Scherer W F, Syverton J T, Gey G O: Studies on propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, 97: 695~709, 1953
  - 3) Jenkin H M: The continuous passage of agents of trachoma in cell culture. *J. Infect. Dis.*, 116: 390~399, 1966
  - 4) 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
  - 5) Nagayama A, Nakao T, Taen H: *In vitro* activities of ofloxacin and four other new quinolone-carboxylic acid against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 1735~1737, 1988
  - 6) Kuo C C, Grayston J T: Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 812~815, 1988
  - 7) Moulder J W, Hatch T P, Byrne G I, Kellog K R: Immediate toxicity of high multiplicities of *Chlamydia psittaci* for mouse fibroblasts (L cells). *Infect. Immun.*, 14: 277~289, 1976
  - 8) Kuo C C: Immediate cytotoxicity of *Chlamydia trachomatis* for mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, 20: 613~618, 1978

#### ＜附 記 (B)＞

- 1) 本報告書はクラミジア MIC 測定法検討委員会により、国際的に通用する測定法の統一化を目的にして検討されたものである。1991年6月5日第39回日本化学療法学会にて改訂版として報告された。

|           |                            |
|-----------|----------------------------|
| 委員 (委員長)  | 熊本悦明 (札幌医大 泌尿器科)           |
| // (副委員長) | 松本 明 (川崎医大 微生物)            |
| //        | 永山在明 (福岡大 医学部微生物)          |
| //        | 副島林造 (川崎医大 内科)             |
| //        | 平井克也 (岐阜大 農学部家畜微生物)        |
| //        | 橋爪 壮 (日本ポリオ研究所)            |
| //        | 萩原敏且 (国立予防衛生研究所 ウイルス中央検査部) |

- 2) MLC (minimum lethal concentration) 測定法については、別途報告する。