

クラミジア MLC 測定法

—日本化学療法学会標準法 (1991 年)—

＜クラミジア MLC 測定マニュアル＞

【原理】：被験クラミジアを接種した HeLa 229 細胞を抗菌薬存在下で培養し、その抗菌薬効果が、抗菌薬を除去し再培養してもなお封入体の再形成阻害を示す最小抗菌薬濃度を検定する。

＜クラミジア取り扱い上の注意＞：

MLC 測定においても MIC 測定法マニュアル [Chemotherapy 40 (3): 303~307, 1992] に記載された注意事項が全て適用される。

〔附記〕

- 1) MLC (minimal lethal concentration)^{2,3)}, MCC (minimal chlamydicidal concentration)^{4,5)}, MBC (minimal bacteriocidal concentration)⁶⁾ は同様の意味で使用されるが、当委員会では用語を統一する目的で MLC を使用することとした。
- 2) 当委員会は、ここに報告する方法と共に次の方法も比較検討した。すなわち、抗菌薬除去後、感染細胞から超音波処理等によって、クラミジアを回収し、それを新しい培養細胞に接種、培養する過程を 3 回繰り返す、封入体形成の有無を調べる方法である。
しかし、この超音波処理を用いる手技は複雑であり、ことにクラミジアの回収が超音波装置や処理時間等によって必ずしも一定でないため、施設によって測定値が大幅に異なる可能性が高いことが判明した。従って当委員会は簡便でしかも抗菌薬の臨床効果を比較的良く反映する今回の方法を採用することとした。
- 3) MLC 測定に際しては同一感染系で同時に MIC 測定を行う必要がある。そして、MIC 測定結果が当委員会による reference strain に対する MIC の範囲内にあることが確認された場合にのみ、MLC 値は有効とみなされる。
- 4) MLC はクラミジアに対する抗菌薬効果をみるための必須事項とはしないが、MIC とともに測定することが望ましい。
- 5) 使用細胞、培養液、接種菌量、IFU の測定法、Reference strain、抗菌薬希釈法、温度条件、および判定法に関する詳細は MIC 測定マニュアルに準じる。

【測定方法】

〔培養細胞の準備〕

- 1) MLC 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。
- 3) 37°C, 5% CO₂ 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。

〔クラミジア接種〕

- 4) 各 well に 10^4 IFU/well (4×10^4 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、測定法に誤りがないことを確認する。
- 5) 室温 $500 \sim 900 \times g$ にて 1 時間遠心吸着を行なう。
- 6) 上清を吸引除去する。

〔抗菌薬付加培養〕

- 7) 各抗菌薬濃度 (Master dilution 法にて希釈) を含む培養液 (Eagle's MEM + 熱非働化 FCS + 終末 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximide) を各 well に 1 ml ずつ分注する。
- 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% CO₂ incubator にて 72 時間培養する。

C. psittaci 培養条件: 37°C (±1°Cは許容範囲), 5% CO₂ incubator にて 48 時間培養する。

C. pneumoniae 培養条件: 35°C (±1°Cは許容範囲), 5% CO₂ incubator にて 72 時間培養する。

〔抗菌薬除去〕

- 9) 抗菌薬含有培養液を吸引除去する。
- 10) 感染細胞を 37°C に温めた Eagle's MEM 1 ml (血清を添加しない) で 3 回洗浄する。
- 11) 抗菌薬無添加培養液 (Eagle's MEM + 熱非働化 FCS + 終末 1 μg/ml Cycloheximide) を 1 ml ずつ分注する。
- 12) *C. trachomatis* および *C. psittaci* は 37°C (±1°Cは許容範囲), *C. pneumoniae* は 35°C (±1°Cは許容範囲) にて, いずれも 5% CO₂ incubator にて 24 時間培養する。
- 13) さらに新たな抗菌薬無添加培養液 (Eagle's MEM + 熱非働化 FCS + 終末 1 μg/ml Cycloheximide) と交換し, *C. trachomatis* および *C. pneumoniae* は 48 時間, *C. psittaci* は 24 時間再び培養を続ける。

〔MLC 判定〕

- 14) MIC 測定法マニュアルに従って, 培養液を吸引後 DFA 法にて染色判定する。
- 15) 100 倍を判定倍率とし蛍光顕微鏡にて全視野を観察し, 封入体を以下の 3 type に区別する (別紙写真参照)。
 - (Normal inclusion): MIC, MLC の control に認められる inclusion, もしくはこれに準じる大きさの [photo A] inclusion で 100 倍で明瞭に認められる。
 - (Small inclusion) : Normal inclusion より明らかに小さいが, 100 倍で明瞭に inclusion と識別できる。 [photo B]
 - (Microinclusion) : 100 倍で spot 状, もしくはやや大きめの spot として認められるが, これを 200 [photo C, D] 倍でみると数個のクラミジア菌体を含む inclusion であることが識別できる。
- 16) Normal または Small inclusion を全く認めない場合を封入体再形成阻害ありと判定する。
 また, Microinclusion のみでは継代培養を繰り返しても封入体を再形成しないため, 再形成阻害ありと判定する。
 この様な判定により, 封入体再形成が阻害された最小抗菌薬濃度を MLC とする。

〈参考資料〉

Reference strain に対する当委員会の MLC 測定成績は次のごとくである。MLC は MIC よりバラツキがあり, レンジがやや大きくなるのはやむを得ないと考えている。

	<i>C. trachomatis</i> D/UW-3/Cx	<i>C. psittaci</i> Budgerigar No. 1	<i>C. pneumoniae</i> TW-183
Minocycline	0.125 ~ 0.5	0.5 ~ 4.0	0.063 ~ 0.125
Doxycycline	0.125 ~ 1.0	4.0 ~ 8.0	2.0 ~ 4.0
Erythromycin	2.0 ~ 4.0	16 ~ 32	2.0 ~ 8.0
Clarithromycin (TE-031)	0.03 ~ 0.125	0.5 ~ 2.0	1.0 ~ 2.0
Ofloxacin	2.0 ~ 16	64 ~ 128	1.0 ~ 2.0

(μg/ml)

〈参考文献〉

- 1) クラミジア MIC 標準委員会 (代表: 熊本悦明): 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) Chemotherapy 40: 303~307, 1992
- 2) Nagayama A, Nakao T, Taen H: *In vitro* activities of ofloxacin and four other new quinoline-Carboxylic acids against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob. Agents Chemotherapy 32: 1735~1737, 1988
- 3) Hessen F W, Muytjens H: *In vitro* activities of ciprofloxacin, norfloxacin, pipemidic acid, cinoxacin, and

- nalidixic acid against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob. Agents Chemotherapy 25: 123~124, 1984
- 4) Mourad A, Sweet R L, Sugg N, Schachter J: Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob. Agents Chemotherapy 18: 696~698, 1980
- 5) Hammgret M R, Gleyzer A: *In vitro* activity of a group of broadspectrum cephalosporins and other β -lactam antibiotics against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob. Agents Chemotherapy 23: 493~494, 1983
- 6) Bowie W R, Lee C K: Prediction of efficacy of antimicrobial agents in treatment of infections due to *Chlamydia trachomatis*. J. Infect. Dis. 138: 655~659, 1978

＜附 記＞

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 ウィルス中央検査部)

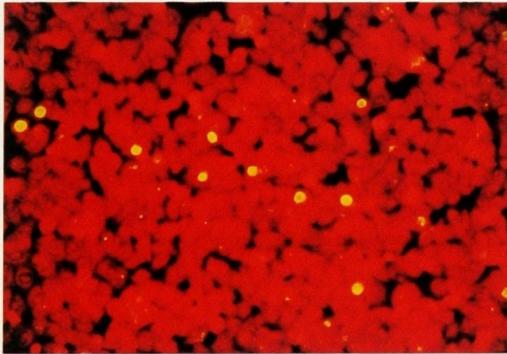


Photo. A: Normal inclusion (倍率 100 倍: 10×10)
 抗菌薬付加のない場合に形成された封入体所見

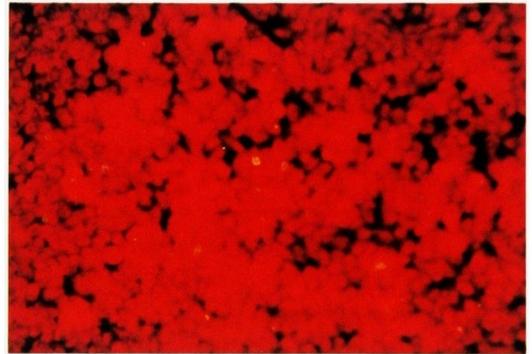


Photo. B: Small inclusion (倍率 100 倍: 10×10)
 OFLX 0.5 μ g/ml 存在下で形成された形成不全の状態の不完全封入体所見

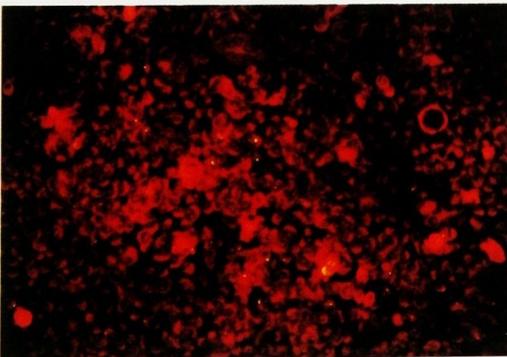


Photo. C: Microinclusion (倍率 100 倍: 10×10)
 OFLX 1.0 μ g/ml 存在下で観察される spot 状の蛍光小体所見。これは封入体と判定しない。

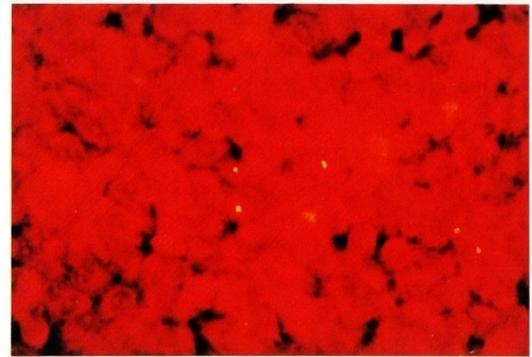


Photo. D: Microinclusion (倍率 200 倍: 20×10)
 Photo C の蛍光小体を倍率を上げて観察すると、数個のクラミジア菌体を含む inclusion であることが識別できるが、封入体と判定しない。