

資料

肺炎マイコプラズマの
凍結保存温度と凍結保存株の
薬剤感受性試験への利用

岡崎則男¹, 大屋日登美¹, 渡辺祐子¹,
佐々木次雄²

Preservation of *Mycoplasma pneumoniae* in Freezing at Various Temperature and Use of the Preserved Strains for Antibacterial Susceptibility Test

Norio OKAZAKI, Hitomi OHYA,
Yuko WATANABE and Tsuguo SASAKI

肺炎マイコプラズマ（以下肺炎マ）は細胞壁を欠くため、温度、pH、超音波あるいは凍結融解等の物理化学的な刺激に対して抵抗性が低い^{1,2)}。また、液体培地あるいは寒天培地で本菌を培養し、終止期以後もそのまま放置した場合は急速に死滅する³⁾。このような肺炎マを長期間保存するために、凍結、凍結乾燥法、あるいはL-乾燥法が利用される⁴⁾が、手技の簡便性から通常は凍結法が利用される。しかし、凍結保存温度に関しては、より低温であれば良いとされているものの、温度別による保存性を比較した報告はない。また、肺炎マの増殖速度は一般細菌と比べて遅く、その上に菌株により異なる³⁾ことから、一度に多数の肺炎マ菌株を使用する薬剤感受性試験において、全株を同程度の発育レベルおよび菌数で供試することが困難であった。供試菌株を同程度の発育レベルで一端凍結し、後日、それらを一度に使用することが可能であれば、能率的な薬剤感受性試験が実施できるばかりでなく、試験の再現性も高くなると考えられる。本報では、-20、-40あるいは-80において数年～20年間保存した肺炎マ分離株482株について、それらの生残性を報告すると同時に、肺炎マの薬剤感受性試験における凍結菌株の使用を検討したので併せて記載する。

1982年～1999年までに神奈川県内で分離され、-20、-40、あるいは-80で保存されていた計482株を対象と

した。これらの菌株は、PPLO 液体培地 (Difco)、ウマ血清 (Gibco) 15%、25%酵母エキス (自製) 10%、ブドウ糖 1%、ペニシリン G 10³U/ml、酢酸タリウム0.025%およびフェノールレッド0.002%から成る培地 2 ml にて培養後、そのまま上記温度にて凍結保存された。凍結保存株の融解は約30の微温湯中で行い⁴⁾、融解後、直ちに上記組成の液体培地に接種し、37で7～14日間培養した。一部の分離株の培養液を肺炎マ用寒天平板培地に接種し、37で10日間培養後、コロニー形態、ニワトリ赤血球吸着性およびTTC還元性(嫌気/好気)等を調べ⁵⁾、肺炎マとしての性状を確認した。

また、肺炎マの薬剤感受性試験に短期間の凍結保存株が使用可能かどうかを調べた。肺炎マ菌数(CFU/ml)の定量は定法⁶⁾に従った。供試薬剤はエリスロマイシン、ジョサマイシン、テトラサイクリンおよびミノサイクリンの4剤(和光純薬)で、これらは肺炎マ感染症の治療に汎用されている抗生物質である。薬剤感受性試験はマイクロプレートを使用した微量液体希釈法⁶⁾で行った。

表1に、凍結保存温度および保存期間別による肺炎マ分離株の生残性を示した。-80で保存した場合の生存率は10年後で100%、20年後においても86.8%であった。しかし、-40で10年間保存すると、70.6%の生存率となり、-20で12年間の保存では5.7%と極端に低下した。このように、肺炎マを10年以上の長期間に亘り保存する場合は、-80が適切であり、-20あるいは-40での保存は避けるべきと思われる。

-80で5年以内、同じく16～20年間、-40で10年間および-20で12年間保存されたそれぞれ62株、33株、31株および4株の計130株につき、ニワトリ赤血球吸着性およびTTC還元性(嫌気/好気)を調べたところ、全株で陽性を示し、これらの性状については凍結保存による変化は見られなかった。

表1 肺炎マイコプラズマ分離株の凍結温度および保存期間による生残性。

温度(℃)	保存期間(年)	株数	生存数	生存率(%)
-80	～5	62	62	100
	6～10	112	112	100
	11～15	149	148	99.3
	16～20	38	33	86.8
-40	10	51	36	70.6
-20	12	70	4	5.7

肺炎マの薬剤感受性試験では、通常、新鮮培養菌が使用されるが、一部の動物マイコプラズマにおいては-70で凍結保存した菌液が使用されている⁷⁾ことから、著

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
2 国立感染症研究所細菌第二部

表2 -80 で4週間保存後における肺炎マイコプラズマの生残菌数.

菌株	CFU/ml	
	保存後	対照* ¹
KS-1018	2.3 x 10 ⁷	8.3 x 10 ⁷
KS-1020	6.8 x 10 ⁷	1 x 10 ⁸
KS-1339	1.2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸
KS-1343	8.6 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁸
KS-1550	3.4 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁷
KS-1560	1 x 10 ⁸	1.2 x 10 ⁸
KS-1676	8.4 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁸
KS-1677	3.6 x 10 ⁷	6.5 x 10 ⁷
KS-1703	1 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷
KS-1990	2.8 x 10 ⁶	9.8 x 10 ⁶

*¹ 新鮮培養液表3 -80 で4週間保存後の肺炎マイコプラズマ(10株)¹の薬剤感受性.

薬剤	MIC * ² (μg/ml)	
	保存後	対照* ³
エリスロマイシン	0.012 ~ 0.024	0.006 ~ 0.024
ジョサマイシン	0.012 ~ 0.098	0.024 ~ 0.098
テトラサイクリン	0.195 ~ 1.56	0.39 ~ 1.56
ミノサイクリン	0.39 ~ 1.56	0.39 ~ 3.12

*¹ 表2参照*² 最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration)*³ 新鮮培養液

者らも肺炎マの凍結 (-80) 菌液が使用可能かどうかを検討した. 薬剤感受性は被検菌液の菌数に大きく影響されることから, まず, 凍結保存による肺炎マ菌数の変化を調べた. 表2に示すように, -80 で4週間保存した後の菌数は, やや減少傾向にあるものの, それほど変化していないように思われた. また, 表3に凍結保存前後における肺炎マのエリスロマイシン, ジョサマイシン,

テトラサイクリンおよびミノサイクリンに対する感受性を示した. 肺炎マのこれらの薬剤に対する感受性に変化は見られなかった. 以上の結果から, -80 で4週間以内の肺炎マ保存株が薬剤感受性試験に供試可能であると思われるが, 今後, より多くの菌株と薬剤を使用した検討が必要である.

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 中村昌弘, 坂本博章: 人系マイコプラズマの温度, pH および振盪に対する安定性, 日細菌誌, 22, 595-599 (1967)
- 2) Kim, K.S., W.A.Clyde, JR., and F.W. Denny: Physical properties of human mycoplasma species, J.Bacteriol., 92, 214-219 (1966)
- 3) 中村昌弘: マイコプラズマ, 佐々木正五, 尾形 学, 中村昌弘 編, pp.8-27, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1974)
- 4) 柚木弘之: マイコプラズマとその実験法, 尾形 学 監修, 輿水 馨, 山本孝史 編, pp.372-376, 近代出版, 東京 (1988)
- 5) 中村昌弘, 伊藤 亨, 市丸弘子: ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定, 日本細菌学会教育委員会 編, pp.23-71, 菜根出版, 東京 (1982)
- 6) Okazaki, N., M.Narita, S.Yamada, K.Izumikawa, M.Umetsu, T.Kenri et al. : Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*, Microbiol. Immunol., 45, 617-620 (2001)
- 7) 村田昌芳: マイコプラズマとその実験法, 尾形 学 監修, 輿水 馨, 山本孝史 編, pp.441-448, 近代出版, 東京 (1988)