

[原 著]

肺炎マイコプラズマ分離用培地の改良および薬剤感受性試験法の検討

奥野ルミ¹⁾・久保田寛顕¹⁾・内谷友美¹⁾・大屋日登美²⁾

平井昭彦¹⁾・甲斐明美¹⁾・貞升健志¹⁾

¹⁾ 東京都健康安全研究センター微生物部

²⁾ 神奈川県衛生研究所微生物部

(平成 27 年 6 月 23 日受付, 平成 27 年 11 月 11 日受理)

近年, マクロライド系薬剤耐性 *Mycoplasma pneumoniae* が増加しており, その動向を把握することがより重要となっている。本報では, 従来の分離培地及び薬剤感受性試験法を改善する検討を行ったので報告する。

M. pneumoniae の分離培養の際に, PCR 法陽性となった咽頭ぬぐい液であっても, 雑菌の増殖等により目的菌の分離が困難な場合が多かった。そこで, 従来から *M. pneumoniae* の分離培地として用いられている PPLO 液体培地の改良を行った。改良した培地を用いてマイコプラズマ感染症疑い患者 108 名の咽頭ぬぐい液から, *M. pneumoniae* の分離を実施した結果, 雑菌の増殖を抑制し PCR 法陽性 31 検体のうち 22 検体 (67.7%) から菌を分離することができた。

次に, 従来から行われている微量液体希釈法は, 薬剤の入手から濃度調製, 分注等を行うなど煩雑であり手間が掛かるため, 簡便なドライプレートを用いた方法を検討した。その結果, 標準株 (M129-B7 株) では MIC 値で 1 管差であり, 従来法とほぼ同等の値が得られた。本法を用いて臨床分離株 18 株について薬剤感受性試験を実施したところ, 15 株 (83%) が erythromycin (EM) 耐性となった。

今回検討した方法を用いることで, *M. pneumoniae* の分離率が向上すると共に薬剤感受性試験が容易になることから, さらに多くの実態調査や解析が可能となると考えられる。

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, 分離培地, 薬剤感受性試験法

序 文

わが国では, 2011 年頃よりマイコプラズマ肺炎の増加が報告されている¹⁾。また, 同時期以降に検出された肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) の多くは, 第一選択薬であるマクロライド系薬剤に耐性であるといわれている^{2)~4)}。*M. pneumoniae* は, 最小クラスの細菌であり, 細胞壁を持たない多形態の細菌である。分離培養には, 細胞内で増殖させるか, PPLO 培地など特殊な培地が必要であることに加え,

発育に時間がかかることから, 分離培地では咽頭ぬぐい液等の検体に混在する口腔内細菌などの雑菌の増殖を防ぐ必要がある。そのため, 分離培地には, ペニシリン, メチレンブルーや酢酸タリウムなどが添加される。また, *M. pneumoniae* は, ガラスなどの固形物に吸着する性質が知られているため, 分離培地には, 寒天培地に液体培地を重ねた 2 層培地が用いられている⁵⁾。

われわれは, 感染症法に基づく感染症発生動向調査の一環として, 2011 年より東京都内の医療機関を受診したマイコプラズマ感染症を疑う患者 184 名 (内訳: 小児 160 名, 成人 24 名) の咽頭ぬぐい液を対象に, *M. pneumoniae* の検出を試みてきた。しかし, 患者から採取した咽頭ぬぐい液を従来の分離用培地で培養しても雑菌が増殖し, *M. pneumoniae* の分離は

著者連絡先: (〒169-0073) 東京都新宿区百人町 3-24-1
東京都健康安全研究センター微生物部
奥野ルミ
TEL: 03-3363-3231
FAX: 03-3363-3246

Table 1. Modified PPLO broth

Difco PPLO broth	2.1 g
0.2% Phenol red	1 ml
Heat inactivated (56°C for 30 minutes) fetal horse serum	15 ml
25% Yeast extract	10 ml
20% Glucose	5 ml
Ultrapure water	70 ml

Adjust pH7.8

PPLO broth was supplemented with penicillin G (10^5 u/100 ml), and modified PPLO broth was supplemented with penicillin G (10^5 u/100 ml) and vancomycin (10^5 u/100 ml).

困難であった。そこで、雑菌の増殖を抑制し、*M. pneumoniae* の発育を妨げない分離培地の検討を行った。さらに、その培地を用いてマイコプラズマ感染症疑い患者の咽頭ぬぐい液から菌の分離を試みた。

一方、*M. pneumoniae* の薬剤感受性試験は、微量液体希釈法により行われるが⁹⁾、従来法では使用薬剤を適宜希釈し96穴プレートに分注する必要があるなど、多検体を処理する上での労力が大きい。そのため、23S rRNA のドメイン V 内のマクロライド耐性に係る変異を調べる方法のみが用いられることが多い。しかし、マクロライド耐性変異の検索は、あくまで過去の研究に基づく既知の変異を確認するものであり、同領域以外に薬剤耐性を生じる遺伝子変異があった場合などは、見逃してしまう危険性がある。さらに、耐性度の指標となる MIC 値を知ることや、マクロライド系以外の薬剤に対する耐性度の判断ができないなどの課題が残る。これらの理由から、分離菌株が得られた場合は、遺伝子の耐性変異の検索だけでなく、薬剤感受性試験を実施することが望ましい。そのためには、微量液体希釈法をより効率化することが重要と考え、一般細菌で使用されるドライプレートを用いた方法を検討し、従来の微量液体希釈法との比較を行うとともに、分離された菌株の薬剤感受性試験を実施した。

対象と方法

1. 培地の検討

培地は、PPLO 液体培地 (Difco PPLO Broth, BD Difco) を基礎培地として、添加する抗菌薬の種類及び酵母エキスの種類について検討を行った。検討用の菌株には、*M. pneumoniae* 臨床分離株 (K1 株) を使用した。また、上記の検討を基に改良した培地を用いて、臨床材料からの分離培養について比較検討した。

(1) 抗菌薬の検討

vancomycin (VCM) は、ペニシリン耐性のグラム陽性菌抑制目的でサイアマーチン培地などにも用いられている。細胞膜合成阻害による抗菌作用は、細胞壁を持たない *Mycoplasma* の発育を抑制せず、口腔内常在菌の発育抑制効果が期待されたため用いることとした。また、VCM の添加により従来法に比べてより高い抗菌作用が期待されたため、改良培地には、毒性が強く劇物として指定されている酢酸タリウム無添加とした。

雑菌抑制のための抗菌薬の検討方法は以下のとおりである。滅菌生理食塩液 10 ml を口に含み 10 秒間うがいをして、健康者のうがい液を作製した。Table 1 に示した培地に、penicillin G (PCG: SIGMA) を単独で添加した従来法 PPLO 液体培地と PCG 及び VCM (SIGMA) の両方を添加した改良培地を作製し、比較した。なお、添加濃度はいずれも 10^5 U/100 ml である。両方の培地 3 ml に K1 株を約 10^5 CFU/ml 接種し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (恒温器の過剰な温度上昇を予防するため、 36°C 設定とした) 湿潤好気条件で培養し、培地の色が完全に黄変した日を培養陽性日として、その日数を測定した。K1 株数は、PPLO 液体培地 (PCG 及び酢酸タリウム無添加) を用いて希釈し、PPLO 寒天培地に接種して発育したコロニーを測定し算出した。さらに、培地に K1 株を約 10^5 CFU/ml 及びうがい液 100 μl を加えて同様の操作を行い、培養陽性日までの日数を測定した。

(2) 酵母エキスの検討

培地に添加する酵母エキスについては、ドライイースト (日本甜菜製糖) を沸騰水浴中で約 20 分間湯煎して加熱抽出し、 4°C で冷却遠心 ($10,000 \times g$, 20 分間) して得られた上清を pH7.6 に調製した後、メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過滅菌した自家製酵母エキスと、市販の新鮮酵母エキス (オリエンタル酵母工業) の比較を検討した。それぞれの 25% 酵母エキスを PPLO 基礎培地に 10% 添加し、さらに PCG を単独で添加、あるいは PCG 及び VCM 両方を添加した培地を作製し、各々の培地 3 ml に約 10^5 CFU/ml の K1 株を接種した。対照培地として、ペニシリン無添加マイコプラズマエンリッチメント (BD BBL) 及び PCG を加えたマイコプラズマ培地 (BBL Mycoplasma Broth Base, BD BBL) を用いて同時に発育試験を行った。

(3) 臨床材料の検討

感染症発生動向調査事業の一環として、当研究室に搬入された検体を対象とした。すなわち、東京都内の

定点医療機関を受診し、マイコプラズマ感染症が疑われた患者の咽頭ぬぐい液 184 検体を対象として、従来法の PPLO 液体培地及び改良培地を用いて、分離培養を試みるとともに、nested PCR 法により *M. pneumoniae* p1 遺伝子の検出⁶⁾を行った。

従来法の分離培養は、2011 年 1 月から 12 月に発症した患者 76 名（内訳：小児 68 名，成人 8 名）を対象とした。患者の咽頭をぬぐった滅菌綿棒（メンテップ IP1504，日本綿棒）を従来法の PPLO 液体培地（PCG 及び酢酸タリウム添加）に入れて室温輸送後 2 分割し、分離培養用及び遺伝子抽出用とした。分離培養用に分割した検体は、新たな PPLO 液体培地に移植し、1 週間～1 ヶ月間（PCR 法陽性の場合は 2 ヶ月間）培養した。

培養後、1 週間程度以降に培地が黄変したものについて、PPLO 寒天培地に継代し、コロニーの観察を行うとともに、LAMP 法（Loopamp[®]マイコプラズマ P 検出試薬キット，栄研化学）で *M. pneumoniae* の確認を行った。

2. 薬剤感受性試験方法の検討

標準株である M129-B7（ATCC29342）株及び臨床分離株 4 株を用い、8 薬剤（erythromycin：EM，clarithromycin：CAM，azithromycin：AZM，josamycin：JM，clindamycin：CLDM，rokitamycin：RKM，tetracycline：TC，minocycline：MINO）の MIC 値について、従来法³⁾及びドライプレート法で比較検討した。ドライプレートは、上記 8 薬剤に 4 薬剤（levofloxacin：LVFX，moxifloxacin：MFLX，gatifloxacin：GFLX，ciprofloxacin：CPF）を加えた計 12 薬剤の濃度を指定し、栄研化学（株）にオーダー注文して作製した（Table 2）。さらに、臨床分離株 18 株については、作製したドライプレートを用いて薬剤感受性試験を実施した。

従来法は、2 倍段階希釈した薬剤を 96 穴の滅菌プレートに分注することにより行った。接種する菌液は、抗菌薬を除いた PPLO 液体培地で菌液を希釈し、 $10^4 \sim 10^5$ CFU/well となるように調製した。

従来法により薬剤を希釈したプレート及びドライプレートに菌液を接種後、湿潤状態に保ち、36℃ 好気培養を行った。薬剤の入っていない対照の培地色調が完全に黄変した時点を測定終了日とし、MIC 値（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を測定した。

測定は 2 回行い、4 管以上差が出た場合は、さらに 2 回再検を行った。

3. マクロライド系薬剤耐性遺伝子の検出

臨床分離株 18 株について、マクロライド系薬剤耐

性に関する 23S rRNA ドメイン V 領域内の点変異⁷⁾の有無を、ダイレクトシーケンス法を用いて塩基配列解析することで確認した。

結 果

1. 培地の検討

PCG のみ添加した従来法の PPLO 液体培地と PCG 及び VCM の両方を添加した改良培地に、それぞれ菌液（約 10^5 CFU/ml）を接種し培養した結果、いずれの場合も 4 日目に培地の黄変が確認された。

また、各液体培地に、うがい液及び菌液を加えて培養した結果、PCG のみ添加した培地は、1 日目で雑菌が発育し培地が黄変し、さらに、雑菌の増殖により培地が懸濁した。しかし、VCM も添加した改良培地では、雑菌の増殖が抑制され、12 日目には、*M. pneumoniae* による培地の黄変が認められた。

酵母エキスについて検討した結果、自家製又は市販の新鮮酵母エキスを添加したいずれの場合も、3 日目に培地の黄変が確認された。対照のマイコプラズマ培地では、6 日目に黄変が認められた。それぞれの培地について黄変が認められた日の培養液について、菌数測定を行った結果、自家製酵母エキスと PCG の場合が 7.1×10^6 CFU/ml，市販新鮮酵母エキスと PCG の場合が 1.6×10^7 CFU/ml，また、自家製酵母エキスと PCG+VCM の場合が 4.0×10^6 CFU/ml，市販新鮮酵母エキスと PCG+VCM の場合が 5.2×10^7 CFU/ml であった。酵母エキスについては、自家製と検討した市販新鮮酵母エキスの間では同等の発育が認められた。

臨床材料から菌の分離を試みた結果、従来法の PPLO 液体培地を用いた 76 検体については 15 検体が PCR 法陽性となったが、すべての検体から菌の分離はできなかった。一方、改良した培地を用いた 108 検体については、31 検体が PCR 法陽性となり、そのうち 21 検体（67.7%）から菌が分離された（Table 3）。また、PCR 法陰性の 77 株については、分離培養も陰性であった。

2. 薬剤感受性試験方法の検討

従来法とドライプレート法により、M129-B7 株及び臨床分離株 4 株について調べた共通 8 薬剤の MIC 値は、Table 4 のとおりである。M129-B7 株は、8 薬剤すべてについて MIC 値として両方法で 1 管（2 倍又は 1/2 倍）程度の差はみられるが、ほぼ同等の値であった。一方、臨床分離株 4 株については、最大 3 管（8 倍または 1/8 倍）の差が見られた。

臨床分離株 18 株の、ドライプレート法による MIC 値は、Table 5 のとおりである。18 株中 15 株（83%）

Table 2. Prescription of Dry-plates

No.1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Erythromycin											
	64*	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
B	Clarithromycin											
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
C	Azithromycin											
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
D	Josamycin											
	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	0.008	0.004
E	Clindamycin											
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12
F	C**	Rokitamycin										
		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
G	Tetracycline											
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
H	Minocycline											
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
No.2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Erythromycin							Rokitamycin				
	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	0.008	0.004	0.12	0.06	0.03	0.015	0.008
B	Clarithromycin							Tetracycline				
	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	0.008	0.004	0.12	0.06	0.03	0.015	0.008
C	Azithromycin							Minocycline				
	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	0.008	0.004	0.12	0.06	0.03	0.015	0.008
D	Clindamycin											
	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	0.008	0.004	C	C	C	C
E	Moxifloxacin											
	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015
F	Gatifloxacin											
	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015
G	Levofloxacin											
	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015
H	Ciprofloxacin											
	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015

* $\mu\text{g/ml}$, **control (Any antibiotics were not added)

がEMに対して耐性 ($1\mu\text{g/ml}$ 以上)であり, TCに対するMIC値は18株すべてが感性 ($2\mu\text{g/ml}$ 以下)であった。

3. マクロライド系薬剤耐性遺伝子の検出

臨床分離株18株について, 23S rRNAの変異を確認した結果, EMに耐性であった15株に変異が見ら

れた (Table 5)。変異の見られた15株中14株は, A2063Gの点変異であり, 1株がA2063Tの変異であることが判明した。

考 察

マイコプラズマ感染症の診断は, 一般的には抗体検

Table 3. Comparisons of the culture medium for the separation of *M. pneumoniae*

Duration of studies	Jan. 2010-Oct. 2011	Nov. 2011-Dec. 2013
Medium	PPLO broth or Two-layer culture medium	Modified PPLO broth
Total no. of samples	76	108
No. of positive samples by PCR	15	31
No. of isolates by cultivation	0 (0%)*	21 (67.7%)

* (%) = (the number of isolates by cultivation/the number of positive samples by PCR) × 100

Table 4. Comparisons of the MICs

Strain No.	Method	MIC (μg/ml)							
		EM	CAM	AZM	JM	CLDM	RKM	TC	MINO
M129-B7*	Conventional	0.0039	0.0039	<0.0002	0.0625	1	0.0625	0.25	0.25
	Dry-plate	≤0.004	0.004	≤0.004	0.03	0.5	≤0.008	0.25	0.25
8165	Conventional	>256	>256	16	4	256	1	1	0.25
	Dry-plate	64	64	8	2	64	0.25	0.25	0.25
8172	Conventional	0.0039	0.0156	<0.0002	0.0625	1	0.0625	1	0.25
	Dry-plate	0.008	≤0.004	≤0.004	0.12	0.5	0.015	0.25	0.25
8196	Conventional	256	>256	4	4	64	1	1	0.5
	Dry-plate	>64	64	4	4	64	1	1	1
8197	Conventional	256	>256	4	4	64	1	0.25	0.25
	Dry-plate	32	64	2	2	32	0.5	1	1

*standard strain (ATCC 29342)

EM: erythromycin, CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, JM: josamycin, CLDM: clindamycin, RKM: rokitamycin, TC: tetracycline, MINO: minocycline

Table 5. Mutation in 23SrRNA gene and MIC ranges of 12 antimicrobial agents of 18 clinical isolates

Mutation in 23SrRNA gene	No. of isolates	MIC (μg/ml) ranges											
		EM	CAM	AZM	CLDM	RKM	TC	MINO	MFLX	LVFX	CPFEX	JM	GFLX
A2063G	14	≥32	≥32	2-8	2-4	0.25-1	0.25-1	0.25-2	0.06-0.12	0.5	0.5-1	2-4	0.06-0.12
A2063T	1	8	4	0.12	32	1	0.5	0.5	0.12	0.5	0.25	4	0.06
None	3	≤0.008	≤0.008	≤0.004	0.5	≤0.015	0.25-0.5	0.25-1	0.12	0.5	1	0.06-0.12	0.12

LVFX: levofloxacin, MFLX: moxifloxacin, GFLX: gatifloxacin, CPFEX: ciprofloxacin

査法によって行われることが多い。また、近年遺伝子検出法や抗原検出法による診断も可能になってきた。しかし、薬剤感受性試験を行うためには、菌の分離は不可欠である。*M. pneumoniae* の分離培養を従来法により実施した場合、雑菌の混入により分離ができないことが多かったため分離培地の検討を行った。

まず、分離培地を構成する新鮮酵母エキスを作製するためには、自家製の熱抽出新鮮酵母エキスを準備す

る必要があり、大型のろ過装置や超遠心機などが必要である。時間も手間も掛かるなど、安定して良質な酵母エキスを得るのは必ずしも容易ではない。そのため、今回は、誰でも入手可能な市販新鮮酵母エキスを検討した。供試した菌株の発育試験では、自家製とほぼ同等の発育が認められた。また、臨床材料からの分離においても良好な結果が得られた。従来法の検査マニュアル⁵⁾によれば、臨床検体からの分離率を向上さ

せるには、自家製新鮮酵母エキスを推奨しているが、今回の結果から市販品の使用でも十分効果があるものと考えられた。

また、分離培地としては、寒天培地に液体培地を重ねた二層培地⁵⁾が用いられることが多いが、培地の調製をできるだけ簡易にし、保存可能期間を長く(-20℃以下で数年安定)するため、今回は液体培地のみで分離を試みた。当初、従来の液体培地で患者から採取した咽頭ぬぐい液を従来の分離培地で培養しても雑菌が増殖し、*M. pneumoniae* 分離は困難であった。また、検査材料は輸送までの保存は、冷凍保存が望まれるが、当センターにおける検査では搬入日程が決められているため、輸送日まで冷蔵保存される場合がある。このように、検体の輸送方法や保存方法による影響も考えられるが、通常でも検体の約1割で雑菌が増殖することから、雑菌の増殖をできるだけ抑制すると共に *M. pneumoniae* の発育を阻害しない方法を検討した。*Mycoplasma* は細胞壁を持たないことから、細胞壁の合成阻害により抗菌作用を発揮するVCMは、*M. pneumoniae* の発育を阻害せず、雑菌の発育抑制の効果が期待された。PCGとVCMを添加した改良培地を臨床検体からの分離に応用したところ、PCR陽性検体から高率(67.7%)に *M. pneumoniae* を分離することができた。これは、うがい液及び菌液を添加し培養した検討において、PCGのみでは抑えられなかった口腔内常在菌の増殖がVCMを追加することで抑制できたことから、VCM添加の効果があり、劇物である酢酸タリウム無添加でも良好な結果を得ることができたと考えられる。しかし、今後より多くの検体を処理する場合を考慮すると、真菌やグラム陰性桿菌が雑菌として混入した場合は、抑制できない可能性もある。そのため、抗真菌薬の添加やメンブランフィルター法による培地の濾過などの方法も視野に入れる必要があろう。

M. pneumoniae の薬剤感受性試験については、薬剤の入手から、希釈、プレート接種まで一連の作業を各施設で行う必要がある。試験法は肺炎マイコプラズマ検査マニュアル³⁾やClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M43-A²⁾に示されているが、市販キット等がないため、手技が煩雑である。そこで、われわれはこのような作業を可能な限り省略して簡便化することを目的としてドライプレート法を検討した。その結果、3管差が認められた薬剤は作製したドライプレートの最大薬剤濃度を超えるものが半数であり、耐性の判定には影響しないものであった。その他の薬剤についてもCLSI M43-Aの基準によれば、耐

性・感性の判定に相違はなかった。また、*Mycoplasma* 及び *Ureaplasma* を対象とした微量液体希釈法による薬剤感受性試験について、評価した研究⁹⁾によると、同一の検体に同一の薬剤を供試した場合であっても、4管(濃度に換算して16倍)以内の差は許容誤差範囲であるとしている。これは、一般細菌に比べ *M. pneumoniae* のMIC値測定が、接種菌数、培養時間、培地のpHなどにより強く影響することや、判定が培地の色調変化を目視で行うため経験を要する。しかし、市販品がないため施設ごとに培地や薬剤の調製を行うことから、施設間でMIC値に差が出ると考えられる。今回の結果は、ドライプレート法と従来法で得られた結果を同等のものとして扱うことが可能であることを示唆している。検討したドライプレートは、注文生産のためやや高額であることや、64 µg/ml以上の濃度ができないなど問題点があるが、従来法と比較すると、非常に簡便である。また、冷蔵で1年間保存可能であることから、より手軽に薬剤感受性試験を実施することができる。しかし、従来法と比較できた株は4株であったため、菌株を増やして検討する必要がある。

今回検討した方法を用いることで、*M. pneumoniae* の分離率が向上するとともに、薬剤感受性試験が容易になることから、さらに検討して実用化できれば、実態調査や疫学解析時の検査法として大変有用なものと考えられた。

臨床分離株18株について12薬剤に対する薬剤感受性試験を行うと共に、マクロライド系薬剤耐性遺伝子の変異を検索した結果、15株(83.3%)に変異が認められ、それらの株はすべて、EMに対するMIC値が、8~256 µg/ml以上であった。一方、変異が認められなかった3株のEMに対するMIC値は0.008 µg/ml以下であり、これらの結果は、Zhaoら²⁾やHongら⁴⁾の報告と同様の傾向を示した。また、Zhaoらは、A2063Gの変異を持つ株は、A2063Tの変異を持つ株よりもEMに対するMIC値が高い(前者は128 µg/mlより高く、後者は32 µg/ml)と報告しているが、今回のわれわれの成績(前者は32 µg/mlより高く、後者は8 µg/ml)も4管以上の可能性があり、同一の傾向を示した。また、CLDMに対するMIC値は、A2063Tの変異を持つ株が3~4管高値であるが、これは測定誤差範囲であるかは不明である。今後、菌株数を増やして検討する必要がある。

以上のことから、マクロライド耐性を詳細に把握するには、遺伝子検査に加えて薬剤感受性試験を実施して比較していくことが重要であると考えられた。

このような疫学的調査が、多くの施設で実施されることで、欧米に比べ日本や中国の調査では高率であるといわれるマクロライド系薬剤の耐性化の実態が明らかとなると考えられる。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) National Institute of Infectious Diseases. Infectious Diseases Weekly Report. 2012. 21.
- 2) Zhao, F., G. Liu, J. Wu, et al. 2013. Surveillance of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China, from 2008 to 2012. *Antimicrob. Agents Chemother* 57: 1521-1523.
- 3) Kawai, Y., N. Miyashita, M. Kubo, et al. 2013. Nationwide Surveillance of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* Infection in Pediatric Patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 57: 4046-4049.
- 4) Hong, K.B., E.H. Choi, H.J. Lee, et al. 2013. Macrolide Resistance of *Mycoplasma pneumoniae*, South Korea, 2000-2011. *Emerg. Infect. Dis* 19: 1281-1284.
- 5) 大屋日登美, 堀野敦子, 見理 剛, 他. 2011. 肺炎マイコプラズマ検査マニュアル. 国立感染症研究所.
- 6) Ieven, M., D. Ursi, B.H. Van, et al. 1996. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. *J. Infect. Dis* 173: 1445-1452.
- 7) Matsuoka, M., M. Narita, N. Okazaki, et al. 2004. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother* 48: 4624-4630.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guideline. CLSI document M43-A 31 (19).
- 9) Waites, K.B., L.B. Duffy, C.M. Bebear, et al. 2012. Standardized Methods and Quality Control Limits for Agar and Broth Micro dilution Susceptibility Testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum*. *J. Clin. Microbiol* 50: 3542-3547.

Examination of the culture medium and susceptibility testing method of *Mycoplasma pneumoniae*

Rumi Okuno¹⁾, Hiroaki Kubota¹⁾, Yumi Uchitani¹⁾, Hitomi Ohya²⁾, Akihiko Hirai¹⁾, Akemi Kai¹⁾, Kenji Sadamasu¹⁾

¹⁾Division of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

²⁾Division of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

Mycoplasma pneumoniae is one of the major causative bacteria for pneumonia, bronchitis and other community-acquired respiratory tract infections. Recently, an increase in the incidence of macrolide-resistant *M. pneumoniae* was reported in China, Korea and Japan. On the other hand, it is difficult to isolate *M. pneumoniae* because of contamination by other bacteria. We sometimes encountered such cases in which *M. pneumoniae* was not isolated using PPLO broth or Two-layer culture media, in spite of the detection of *M. pneumoniae* genes by PCR. Therefore, a modified culture medium with VCM was improved for the isolation of *M. pneumoniae* from the swabs of patients' pharynxes. *M. pneumoniae* was cultured from 68% out of swabs in the *pl* gene of *M. pneumoniae*-positive samples, when an improved medium was used. Antimicrobial susceptibility testing was performed using two types of broth micro-dilution methods. We compared the MICs of using the dry-plate (EIKEN Chemical Co., Ltd.) with the conventional method. No difference had observed in the MICs of the five *M. pneumoniae* strains including the standard strain. The improved culture medium and simplify antimicrobial susceptibility testing for *M. pneumoniae*, were very useful at laboratories for the investigation of *M. pneumoniae*.