

綜 合 討 論

(座長：国安主税) これからの総合討論は、試験管内実験関係の問題と、生体内実験関係の問題にわけて行うこととする。

(座長：山本孝史) まず最初に試験管内実験関係の問題について、皆さんが研究をやっている上での疑問点、悩んでいる点などについて遠慮なく話題をだしていただき、問題点をうかび上げたいと思う。

(発言：村田昌芳) マイコプラズマの薬剤感受性測定上、大きな問題は、1) MICをどの時点で判定するかという点と、2) 接種菌数をどれぐらいにしたらよいのか、の2点であるが、特に2)の点については、菌数が多すぎても、少なすぎてもMICの判定上問題があることは皆が経験していると思う。この点に関し高橋氏のやっている方法をききたい。

(答：高橋 勇) (発言の内容は本文1～2頁とほぼ同様なので、省略)

(質問：山本孝史) (高橋氏に)今回示された測定方法はどのマイコプラズマの場合にも応用できるだろうか。

(答：高橋 勇) この方法は、MG以外に少なくともMSについては準用可能であるが、他のものについてはやっていないのでわからない。

(質問：清水高正) われわれは、文献上示されているどの方法がよいかということで、いろいろやっているが、これといったものがなく、その間にある特定の菌種の場合の経験として次のことがあった。すなわち、種々な菌数を(培地上に)おとしてみると、どの濃度で完全発育阻止がおこっているかわからないことがある。その一つとして、*M. bovirhinis*があったが、橋本氏の場合、そのような現象がなかったかうかがいたい。もう一点として、橋本氏は培地に生血清を加えているが、他の三人の演者は生血清(特にFreyの培地の豚血清で)を使ったのか、加熱血清を使っ

たのか、またその際(両血清間にMICの)差がみられるのかうかがいたい。

(答：橋本和典) 1) 加熱血清を用いた経験はない。2) *M. bovirhinis*の場合、判定困難なダラダラと(高濃度の薬剤加培地まで)菌の発育がみられることが株によってはあった。すなわち本菌では、 $10^4 \sim 10^5$ /白金耳の菌数を培地にスポットしたが、同菌量を接種したのも、菌株により、突然変異によると思われる少数の集落の出現が(高濃度培地まで)長く続くものがあった。また集落が対照に比較して(薬剤加培地では)小さく、MIC判定上苦しんだ。そこで実体顕微鏡で観察し、集落の出現が確認できるか否かで、MICの限界を判定した。なお以上のうちで、(培地上に)少数の集落しか出現していない場合、上述の接種菌量から考えて、突然変異菌とみなして、判定対象からは除外した。

(答：高橋 勇) (清水氏に)われわれのMGの場合には 56°C 、30分加熱血清を用いた。その理由は、生血清のままでは、薬剤の作用に影響を及ぼす物質が存在しているのではないかという懸念と、実際に生血清よりは加熱血清の方がMGの発育が早く、菌数も多かったという経験的事実に基いている。後者の発育の点について家衛試の柚木氏や東洋醸造の星野氏の私信によると、われわれの場合と同様の成績であったという。なおわれわれは、両血清間でMICに差があるか否かまでは調べてはいない。

(答：村田昌芳) われわれはFreyの培地の場合には生血清を用い、栄研のPPLO培地の場合には馬血清(MG抗体フリー)を非動化して用いている。

(発言：清水高正) 特にデータがあるわけではないが、文献上で考察として述べられているものに、試験管内感受性試験と生体内の効果とのつながりを考えるときに、補体が存在した方がより

効果があるのではないかというものがあつた、この点からはむしろ生血清を用いた方がよいとも考えられるし、逆に高橋氏が先にいったように、菌が発育しやすいという条件の方がよいとも考えられ、どちらかに規定してもらつたとよいと思う。

(座長：山本孝史) いままでご指摘があつた点は、接種菌量と培地成分について、であるが、そのほかに発言はないか。

(質問：国安主税) 使用菌株の継代数と薬剤感受性の関係について、どなたかやっていたら教えてほしい。実はわれわれが以前にMGについて実験をやつたときには、株を凍結乾燥から復帰培養して、少くとも5代以上継代して使用していた。つまり菌が培地に慣れ、しかも対数期にあるものを使用していたが、この問題についての経験を伺いたい。

(答：橋本和典) 直接のお答えではないが、われわれの場合、菌株は分離後、クローニングや血清学的検査のために、3~4代継代するため、その後はなるべく継代しないように凍結乾燥あるいは-80℃保存をしている。継代のすすんだ株とそうでない株の比較実験はやっていない。

(座長：山本孝史) 先の国安氏の発言の主旨は、供試前に凍結乾燥あるいは凍結から復帰培養した株を4、5代継代した方がより安定な成績がえられるという意味だと思つたが、この点はどうか。

(意見：高橋勇) (国安氏に) 菌の薬剤感受性試験の場合に、本来ならば菌株はあまり継代しない方が望ましいのはもちろんであるが、先のお話の中にもあつたように、MGの場合には、凍結や凍結乾燥から復帰培養すると1~3代頃は発育がわるく、薬剤感受性試験には不適當な条件である。つまり菌の発育がわるければ、本来の意味で、菌の薬剤感受性(MICの値)に大きく影響を及ぼすことになる。そこでわれわれは次善の策として、凍結等から復帰培養したものを数代は継代し、2、3日で発育できるようになつた安定な状態のものを用いることにしている。

(座長：山本孝史) 以上ご指摘があつた点を要約すると次のようになると思う。

- 1) 使用菌株について：研究者相互の薬剤感受性試験のデータを比較するためには、各マイコプラズマについては標準株の選定が必要であろう。また供試分離株については、分離年度、分離場所、継代数などを明示することが必要であろう。
- 2) 使用薬剤について：標準品を使用すること。できれば一定の機関で標準品を保存し、分与するようにすること。
- 3) 試験方法について：培地組成(基礎培地、使用血清)、液体培地法か、固型培地法のいずれがよいのかの問題、接種菌量の問題、菌株の培養日数の問題つまり供試菌株の前培養は対数期のものにするか、凍結したものを使うのか、本試験の培養日数の問題すなわち、initial MICかfinal MICかという点。

(質問：橋本和典) 高橋清人氏に追加質問したい。先の豚のマイコプラズマの報告はinitial MICの判定であつたと思つたが、これとfinal MICとの読みの問題はどう考えるか。

(答：高橋清人) final MICの方がinitial MICより数段上となる傾向があつた。(録音不良のため一部のみ集録)

(座長：国安主税) 次に生体内実験の問題について、討論に入ることとする。

今回の村田氏の報告は、実験感染鶏による成績であるが、これに関連して何か発言はないか。またこのような実験では薬剤の吸収、排泄の問題もからんでくるので、米沢氏に鶏の日令による吸収・排泄のちがいがあるかどうかをうかがいたい。

(答：米沢昭一) 鶏のヒナの場合、薬剤を飼料添加したときには日令の若いほど体重あたりの飼料の摂取量が多いので、薬剤の(体重あたりの)摂取量は多くなる。その後次第に体重の方が上回つて、その割には摂取量が少なくなるから薬剤の摂取量は減ってくる。特にブロイラーの場合はこの傾向が強い。

(質問：国安主税) 米沢氏の先の特別講演の中で、鶏と豚とでは同じ薬剤であっても吸収・排泄がちがうということであったが、鶏に限って見た場合、品種、系統によって(吸収・排泄の)ちがいがいいのか。この点は今後の生体内における薬剤の効果の判定上の問題に関係してくるので、うかがいたい。

(答：米沢昭一) 品種間の差(があるかどうか)についてはみていない。

(質問：国安主税) (村田氏に)MGは粘膜感染により、呼吸器系で増殖して病気をおこすが、村田氏の場合のように、菌を直接気嚢内に注入し、薬剤の効果判定するという方法は、試験管内とどのようにちがうかという問題を含め、菌の接種ルート(と効果判定)の問題について、ご意見があったらうかがいたい。

(答：村田昌芳) その点については、現存のところははっきりした見解はもっていない。むしろ佐藤静夫氏の見解をうかがいたい。

(答：佐藤静夫) われわれは、抗菌剤のことについて深く研究をやっているわけではなく、ニューカッスル病生ワクチン投与時においてMGの感染を防ぐのはどうするかという点に目的があるので、MGの感染ルートは気道つまり鼻腔内、気管内接種のデータしかもっておらず、気嚢内接種との関係については何もいえない。実際問題として、野外では特に初生時代のヒナの場合、MGは上部気道にいるので、ヒナのときに気嚢炎をおこしているということはあまり考えにいれなくてもよいと思う。したがって初生ヒナではMGの接種法として、ニューカッスル病生ワクチン投与時のことを考えにいれて、点鼻のような方法で上部気道に感染をおこさせ、そのMGの増殖を十分抑制できる薬剤量がどれぐらいかということ調べる評価法が一つである。村田氏の場合には試験管内に近い感覚で気嚢内という場を使ってやっているわけであり、おそらくデータははっきりであると思うが、私たちの実験の場合は野外への対応と

いう感覚で行なったわけである。はたしてどちらがよいかということはいえないが、上部気道感染させた場合でも、ある程度の薬効の評価はできると思う。

(意見：村田昌芳) たしかに佐藤氏のいわれたような面と(私どものやっている面と)両方の面があると思う。さかのぼると動物実験のあり方の問題になってくる。田嶋嘉雄先生が言われるように動物実験のやり方として、いわゆるドラマタイプとレフレックスタイプの2つの型があり、私の場合には、生体内でも試験管内に近い条件での実験ではあるが、厳密なものさしで計れるという点があり、若干自然の型とはちがってもいいということをやっている。

(質問：橋本和典) (米沢氏に)薬剤の吸収・排泄の問題について、牛や豚では簡単にしらべられないと思うので、実験動物たとえばウサギやヤギでのデータで推測するというやり方はどうなのか。

(答：米沢昭一) その点は行政上の問題(薬事上の規準など)が関係しており、提出資料として(薬剤を使用する)対象動物以外のものは認められないことになっている。

(意見：橋本和典) そうなると牛については、今後どこかで(吸収・排泄の)データをだしてくれないと、研究者も製薬会社も困ると思う。

(意見：国安主税) いまのことに関連して、(抗菌剤の薬効評価の場合に)感染実験の接種ルートは自然感染ルートでやるのがいいのではないかという問題につながってくると思う。

(意見：高橋 勇) 私は生体内実験に関する経験は多くないが、先ほどから論議されている薬剤の生体内効果の判定法について、次のような一般の見解をもっている。すなわち通常は薬剤が試験管内で菌に対する有効性を認められれば、生体内実験に進むわけだが、その第一段階では、確立された感染モデルを用いて実験を行い、そこで有効性が認められたときには、それをもとにさらに

第二段階として自然感染に近い条件を設定して薬剤評価を行う、というのが順当な方法ではないかと考えている(実際問題として、自然ルートによる感染法は感染成立に至る条件が複雑な場合が少なくないので、薬効の判定が困難となることもありうると思われる)。今回の鶏のMGの場合についていえば、村田氏の行なっている感染方法は、上述の第一段階における感染モデルの実験として意義があり、自然感染ルートによる実験は次の段階で行なえばよいと思う。

(意見：村田昌芳) 私の場合には、一つにはMGと大腸菌の混合感染ということが頭にある。つまり大腸菌の場合、自然条件では吸入により気嚢へゆき、そこで病気をおこすのだという考え方が米国の研究者にかなり強いこと、もう一つは、実験の方法として自然の型に近いやり方とインディケータ的なやり方があり、私は後者も一つの方法でないかと考えている点である。

(意見：佐藤静夫) 先述の私の意見は、村田氏のやった方法を否定しているわけではなく、その方法によれば実験の精度はいいと思うが、実際に野外で対応する場合には自然感染ルートによる実験も必要だと思う。例えばMS (*M. synoviae*) に対し、タイロシンは試験管内では有効だが、MGのように実際に生体内で有効だというデータがでていない。これには試験管内とは異なる問題がからんでいると考えられる。要するに自然感染ルートでやってみることが必要だという意味の意見である。

(座長：国安主税) いままでの生体内実験に関する討論をまとめると次のようになると思う。

- 1) 使用動物について：吸収・排泄の問題もからんでくるので、使用動物の年令、品種は統一すること。
- 2) 使用菌株について：菌株を規定し、その継代、保存に十分注意する。
- 3) 菌の接種ルートについて：モデルはモデルとして、野外応用上の問題もからむので、なお

検討の余地がある。

4) 薬剤投与について：残留、吸収・排泄との関連を考えた薬剤の投与方法をえらぶ必要がある。

5) 薬剤の投与期間と投与量について：どれぐらいの期間、どれぐらいの量を投与するのかの問題について、今後検討する必要がある。

6) 効果の判定法について：判定の方法と判定までの期間を今後検討する必要がある。例えば菌接種し薬剤投与後24時間で判定した場合には、試験管内とあまり条件が変わらないのではないかと考えられること、などがある。

(提案：村田昌芳) 以上の問題点について、会で整理し、これを関係者の方々に宿題としてまとめていただきたいと思う。

もう一つマイクロプレート法による感受性試験の問題点についても次の機会に考えてほしい。

(答：事務局高橋 勇) そのようにしたいと思う。

(座長：国安主税) いずれにしても問題点を整理、公表して批判を迎うこととしてほしい。

(以上)

(おことわり) 以上の講演内容に関する質問、応答、意見の概要は事務局の責任で、当日の録音テープから集録したものである。

しかしながら、集録にあたって、約50分にかわたる発言内容をすべてそのまま文章とするのは紙面が許さないこと、またテープ録音の言葉をそのまま文字にしたのでは第三者にかえってわかりにくい場合が少なくないことなどの理由から、録音を何回も聞きなおしながら、発言者の話の主旨を活かし、かつ第三者に理解されやすい文章表現(必要に応じてカッコ内に記入した語句を補足)で要約することに努力した。

しかし録音ができとれなかった場合もあり、また集録者の聞きまちがいや意味のとりちがいの場合もあるかもしれない。もしその場合には、ご寛

容の上誤った点をご指摘をいただき、後日訂正したい。

(事務局 高橋 勇)