

# 1. 鶏由来マイコプラズマの薬剤感受性と耐性について

高橋 勇 (日本獣医畜産大学)

著者は過去7, 8年来, 標題の問題に関して検討してきたので, 以下その成績(未発表分も含む)を総括して述べることにする。

(1) *M. gallisepticum*(MG) の薬剤感受性試験の方法について

MGの薬剤感受性に関する従来の報告をみると, 試験法がさまざまで一定のものはない。そこで著者は従来行われてきたいくつかの方法を検討し, それらの長所を活かした改良法を案出したので, 以下それを紹介する。

方法の要点をあげると, ①この試験には液体培地希釈法を使用する, ②接種菌量は液体培地の2~3日培養菌を100倍希釈し, その0.1 ml(約 $10^5$  CCU)とする, ③MICの判定は対照培地で菌

の発育(培地の黄変により判定)が認められた日から3日後に行う(final MIC, 以下FMICと略), というもので詳細は著者の別稿<sup>1)</sup>に記載した。

以上の3点に補足説明を加えると, ①で液体培地法を採用した理由は, 本法との比較実験の結果, 寒天培地法ではMICの判定を的確に行うのに困難を感じたため, 液体培地法による報告が多いのも同じ理由からであろう。しかし今後寒天培地法も再検討の余地がある。

②の接種菌量の問題は, 一般細菌の測定法<sup>2)</sup>と同様に, MGでも薬剤耐性突然変異菌の出現(例えばEM耐性菌は試験管内で容易に出現<sup>3)</sup>)その他による影響を除外するために,  $10^6$  CCU以下

表1. *M. gallisepticum* のEM<sup>1)</sup>感受性の接種菌量および判定時期による差異

株	接種菌量	$\mu\text{g/ml}$								対照
		0.0015	0.003	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	
KP13 <sup>2)</sup>	$10^{-1}$ ( $10^7$ CCU) <sup>3)</sup>	2 <sup>d4)</sup>	2	2	2	2	6	8	▽	2 <sup>d</sup>
	$10^{-3}$ ( $10^5$ CCU)	2	2	3	7	▽				2
	$10^{-5}$ ( $10^3$ CCU)	3	4	7	▽					3
	$10^{-7}$ ( $10^1$ CCU)	5	6		▽					4
14 <sup>2)</sup>	接種菌量	$\mu\text{g/ml}$								対照
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
	$10^{-1}$ ( $10^7$ CCU)	2	2	2	2	2	2	5	▽	1
	$10^{-3}$ ( $10^5$ CCU)	4	4	4	4	6	▽			3
	$10^{-5}$ ( $10^3$ CCU)	6	6	6	7	9	▽			3
$10^{-7}$ ( $10^1$ CCU)	9	9	9	▽					5	

- (注) 1) EM(エリスロマイシン)  
 2) KP13株は標準株, 14株はマクロライド耐性株。  
 3)  $10^{-1}$ は本菌のPPL Oブジョン培養原液(約 $10^8$  CCU/ml)の0.1mlを接種した場合。  
 4) 表中の数字はすべて菌を接種してから培地が黄変するまでの日数。  
 5) 表中の点線は対照培地の黄変日における阻止限界を示す。  
 実線は接種後10日間観察による阻止限界を示す。  
 6) ▽印はMLC(最小殺菌濃度)を示す。

とするのが適当と思われた。実際に表1の成績によると、本菌のEM感受性は従来多くの報告者の行っている原液接種法(約 $10^7$ CCU)で測定した場合はMICがかなり大きな値となるが、それ以下の接種量では相互に大きな差がなく、次の③で述べる判定時期の問題もあわせ考慮して、前述の100倍希釈液接種法が妥当と判断された。尾形<sup>4)</sup>も $10^3 \sim 10^5$ CFU接種法を記載している。

③について、MGの液体培地での発育の判定は、培地の黄変(ブドウ糖の代謝)を指標としており、菌接種後黄変までの日数は、薬剤無添加培地でも数日を要するが、薬剤添加培地では薬剤濃度の増加に伴い、菌の代謝がある程度影響をうけて黄変までの日数は延長するものと思われる。実際に表1の成績(特にNo.14の場合)はこのことを示唆している。したがってFMIC判定法による方が適

当と考えられた。次にFMICで判定する場合、どの時点を選ぶかの問題がある。接種後の期間が長くなると、薬剤によっては力価の低下がおりMICに影響を及ぼすおそれもあるため著者は多くの観察結果から、前記のように対照の黄変を認めた日から3日後にMICを判定し、以後の成績は参考程度に止めるのが適当と考えた。

なお本法は*M. synoviae*についても実験の結果、準用できることがわかった。

(この項は未発表の成績による)

(2) MG野外分離株の耐性、特にマクロライド系(Mac)に対する交叉耐性について<sup>5)</sup>

国内7地区の分離株(45)と対照株(4)についてOMとOTC(薬剤の略号名は表2注参照)に対する感受性を調べ、表2の結果をえた。野外株には、対照株のMICの10倍以上の値を示すもの

表2 *M. gallisepticum* の野外分離株の薬剤感受性(MIC)<sup>5)</sup>

薬 剤	μg/ml 株	<0.05	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	≥100
		OM <sup>1)</sup>	F <sup>2)</sup>	2	6	12	1	1	1	1
	C			4						
OTC	F		1	17	18	2	1	1		
	C				3	1				

(注) 1) OM(オレアンドマイシン), OTC(オキシテトラサイクリン)

2) F(野外分離株:45株), C(対照株:4株)

3) MIC測定は培地希釈法による。

がOMに対して18株(45%), OTCに対して1株あり、これらは耐性と判定された。この成績は野外の鶏群間にMac耐性MGが増加しつつあることを示唆する。

以上のOM耐性株から12株を選んで、表3にあげたMacの6剤(略号名は本表注参照)に対する交叉耐性の有無を検討した。その結果は表に示したように、全株とも供試6剤に対し交叉耐性

を示し、それぞれに対する耐性度(対照株に対する被検株のMICの倍率)は表に示した通りの値であった。

被検株は供試薬剤に対する耐性度により、次の3型に大別された。すなわち、a) OMとEMには顕著な耐性(≥10.000倍)を示す一方、TSには大部分が20倍、LM、SPM、JMには100~500倍のごとくに、薬剤によって耐性度の

表3 *M.gallispiticum* の6種類のマクロライド系薬剤に対する交叉耐性<sup>5)</sup>

株		薬剤	OM <sup>3)</sup>	EM	LM	SPM	JM	TS
自然耐性株 <sup>1)</sup>	3	>10,000 <sup>4)</sup>	10,000	200	200	500	20	
	4	>10,000	10,000	200	200	500	20	
	5	>10,000	10,000	100	200	500	20	
	6	>10,000	10,000	200	200	500	100	
	8	>10,000	10,000	100	100	500	20	
	11	>10,000	5,000	2,000	2,000	10,000	10	
	21	>10,000	5,000	2,000	2,000	10,000	100	
	10	2,000	10,000	1,000	10,000	10,000	200	
	20	2,000	5,000	2,000	2,000	10,000	200	
	14	2,000	10,000	1,000	2,000	10,000	200	
	22	1,000	1,000	1,000	10,000	10,000	200	
16	200	500	200	200	1,000	200		
人工耐性株 <sup>2)</sup>	OM耐性株	>10,000	10,000	100	100	100	20	
	SPM耐性株	200	50	200	1,000	1,000	10	
	TS耐性株	100	50	200	1,000	1,000	10	
対照株	KP13	1	1	1	1	1	1	
	(MIC) ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	(0,05)	(0,01)	(0,05)	(0,05)	(0,01)	(0,005)	

(注) 1) 自然耐性株はマクロライド耐性の野外分離株。

2) 人工耐性株は標準株(KP13)をそれぞれOM, SPM, TSに対し試験管内で耐性化させたもの(SPM, TS各耐性株は国安博士より分与)。

3) OM(オレアンドマイシン), EM(エリスロマイシン), LM(キタサマイシン), SPM(スピラマイシン), JM(ジヨサマイシン), TS(タイロシン)

4) 表中の数値は対照標準株KP13のMICに対する被検株のMICの倍率。

5) MICの測定は液体培地希釈法による。

差が大きな型(№3~№6), b) 6剤に対しほぼ平均して強い耐性(TSには200倍,他の5剤には1.000~10.000倍)を示す型(№11~№22), c) 上記のb)の型に類似するが, 耐性

度が若干低い型(№16)の3種である。なお以上のうちTSの耐性がいずれの型でも他の5剤より耐性度が低かったことは注目される。

また表4下欄に示した人工耐性株の場合, OM

耐性株は上記の a) の型に、SPM と TS 耐性株は b) の型に類似する態度を示した。

以上の MG の Mac 各薬剤に対する交叉耐性の態度はブドウ球菌の場合<sup>6)</sup>とは若干異っている。

(3) Mac 耐性 MG の新抗生剤に対する感受性について<sup>5)</sup>

以上のような Mac 耐性 MG の増加の状況から、これらにも有効な薬剤の検討が必要となってきた。

表 4 *M. gallisepticum* に対する各薬剤の MIC<sup>7)</sup>

薬剤 \ 菌株		$\mu\text{g/ml}$											
		0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.57	3.12	6.25	>6.25
SPM <sup>1)</sup>	MR <sup>2)</sup>								1		(>) 13 <sup>4)</sup>		
	C				2		1						
PMM	MR									1		9	4
	C			1	1	1							
TM	MR			1	13								
	C	2		1									
DOXY	MR				1		6	7					
	C						3						
DM-CTC	MR					1	7	6					
	C						1	2					
MINO	MR				1	6	7						
	C					2	1						

(注) 1) SPM (スピラマイシン), PMM (プロピオニールマリドマイシン), TM (チアムリン), DOXY (ドキシサイクリン), DMCTC (デメチルクロルテトラサイクリン), MINO (ミノサイクリン)

2) MR (マクロライド耐性株: 14株), C (対照株: 3株)

3) 表中の数字は当該MICを示した菌株数を示す。

4) > 3.12  $\mu\text{g/ml}$  が13株あったことを示す。

そこで演者らは Mac 耐性株 (MR株) を14株に对照の3株を加え、表4に示した5種の新抗生剤 (薬剤の略号名は表4注参照) に対する感受性試験を実施した。その結果は表4の通りで、MR株はすべてSPMには耐性を保有することが再確認され、同時に Mac の新薬 PMM にも交叉耐性 (対照株の  $\geq 6.4$  倍の MIC) を示すことが判った。一方他の4種の新抗生剤の MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )

を調べたところ、MR株と対照株の値は大差なく、大部分の株に対して、TMが0.05, DOXYが、0.2~0.4, DMCTCが0.2~0.4, MINOが0.1~0.2の値であった。これら4剤はさらに生体内効果についても検討を行う価値があろう。

(4) *M. synoviae* の薬剤感受性について<sup>7)</sup>

最近、国内の鶏群への本菌の浸潤が問題化している。一方本菌の薬剤感受性に関しては Kleven<sup>8)</sup>

表5 *M. synoviae* に対する各薬剤のMIC<sup>7)</sup>

薬 剤 \ $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.57	3.12
SPM <sup>1)</sup>							1	11	1	
TS		5	3		1					
TM					1	9	3			
OTC						6	4	1	2	
DOXY					8	2	2	1		

(注) 1) 薬剤名は表2, 4を参照。

2) 表中の数字は当該MICを示した菌株数。

の報告以外はみられず, なお検討を要する。

著者らは本菌の5県からの分離株(10)と標準株(3), 計13株について, 表5にあげた5剤のMIC( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を測定した結果, 大部分の株に対し, SPMが0.8, TSが0.012~0.025, TMおよびOTCが0.2~0.4, DOXYが0.1の値であった(このうちTS, OTCの値はKleven<sup>8)</sup>のそれとほぼ一致)。しかしこれらの生体内効果については今後十分な検討が必要であろう。

菌株を分与いただいた, 家畜衛生試験場・国安主税, 佐藤静夫両博士, シオノギ製薬・油日ラボラトリーズ, 愛知県経済連吉村昌吾博士ならびに北里研究所久米勝己博士に深謝する。

#### 文 献

- 1) 高橋勇(1977). 抗菌剤の効力試験法, 小華和忠ら編, 動物用医薬品・飼料添加物・新飼料の有用性評価法, フジテクノシステム, 東京, 155-192.
- 2) 三橋進(1970). 薬剤と耐性菌, 朝倉書店, 東京, 228-236.

- 3) 近藤房生ら(1973). *M. gallisepticum* のエリスロマイシン突然変異, 医学と生物学, 87, 315-320.
- 4) 尾形学ら(1971). マイコプラズマと抗生物質, モダンメディア, 17, 299-311.
- 5) 高橋勇ら(1971). *M. gallisepticum* の野外分離株における薬剤耐性について, 日獣学誌(学会号), 283.
- 6) 三橋進(1967). 細菌の薬剤耐性, 植竹久男ら編, 細菌遺伝学, 朝倉書店, 東京, 413~426.
- 7) 川畑悦子, 高橋勇ら(1979). *M. gallisepticum* および *M. synoviae* の薬剤感受性について, 第87回日本獣医学会講演要旨, 81.
- 8) Kleven, S.H., et al. (1971). In vitro activity of various antibiotics against *Mycoplasma synoviae*, *Avian Dis.* 15, 551-557