

3. 鶏由来マイコプラズマの薬剤感受性測定法について

村田 昌 芳

(広島大学生物生産学部衛生微生物学講座家畜衛生学研究室)

Procedure for Drug-Susceptibility Test of Fermentative Chicken Mycoplasmas

Masayoshi Murata

Department of Microbiology and Hygiene, Faculty of Biological
Science, Hiroshima University, Fukuyama 720

鶏由来の醗酵性マイコプラズマ、特に *Mycoplasma gallisepticum* (MG) および *Mycoplasma synoviae* (MS) についての薬剤感受性測定法については、国内外を通じて多くの先人により種々の方法が報告されている (3-5, 7-10, 15-17)。しかし一般細菌における⁶⁾と異なり、その標準化はごく少数例をみるに過ぎない^{14, 15, 17)}。

わが国では、さきに高橋 (1977)¹⁵⁾ が 国安・佐藤と協議のうえ、MGの薬剤感受性試験法 (試案) を提案したが、これは液体培地希釈試験管法の1種である。これを端緒として1981年本研究会の中に「家畜のマイコプラズマ薬剤感受性測定法検討委員会」ができ、各種動物由来マイコプラズマ・ウレアプラズマの薬剤感受性測定法の標準化を目的として過去3年間種々の検討を重ねて来た。

一方、外国でも Senterfit (1983)¹⁴⁾ は microtiter system によるマイコプラズマの薬剤感受性測定法の標準的な方法を記載しており、また Whithair ら (1983)¹⁷⁾ も後述するように薬剤感受性測定法の詳細な関係要因を分析したのち、鳥由来醗酵性マイコプラズマの Microtiter system による薬剤感受性測定法の標準的方法を記載している。

ここでは、以上の事柄を参考にしつつ特に前述の検討委員会の討議を踏まえて、MGとMS

についての3種の薬剤感受性測定法の標準化試案作製の参考として、筆者らが行っている方法を以下に述べ、話題提供の資とした。

1. 培 地

MG用の培地としては表1に示すとおり、基礎培地としてはニワトリ PPLO 培地 (栄研)、

表1. *M. gallisepticum* 用培地

A) 液体培地

基礎培地: ニワトリ PPLO 培地 (栄研)
(変法 Barber の培地)¹³⁾

添加: フェノール・レッド 0.002%
(マイクロタイター法の場合 0.004%)

— pH 7.8, 波菌冷却 —

馬血清 (非働化) 10~20%
ペニシリンGカリウム 1,000U/ml

用途: 薬剤感受性測定用培地 (試験管法)
マイクロタイター法
接種菌培養, 希釈, MG分離, 培養

B) 寒天培地

上記の培地に Bacto-agar (Difco) を 1.5% に添加。

用途: MGのCFU測定

- の生残性試験
- のクローニング
- の薬剤感受性試験 (平板希釈法)

すなわち変法Barberの培地¹³⁾を用い表に示すとおり手順で添加物質を加えて培地を調製する。本培地の液体ならびに寒天培地の用途は表1に示すとおりである。

MS用の培地としては、表2に示すFreyの培地²⁾を用いる。その基礎培地としてはMycoplasma broth base (Frey), dry-form (GIBCO)を用い、表に示す手順で添加物に加え、培地を調製する。なお、添加物としての1% NAD 1 mlと1% Lシステイン塩酸塩 1 mlは-20℃に凍結保存しておき、使用前融解して両者を混合し10分後に培地に2%の割合に添加する^{11,12)}。

このFreyの培地は、Chalquest (1962)のC培地¹²⁾で代用してもよい。

Freyの培地は各研究者により種々の変法処

方が考案されている^{1, 2, 11, 12, 17)}。なお、この培地は元来MS用とされているがMGも発育するのでMS・MG兼用培地としても用いられる。MG単独に使用する場合には、基礎培地への添加物のうちβ-NADとLシステイン塩酸塩は削除してもよい。

Freyの液体および寒天培地の用途は表2に示すとおりである。

なお、上述の両培地に添加する血清はマイコプラズマ・フリーでなければならない。

また、後述する薬剤感受性試験用の培地中の供試薬剤の最終濃度は、原則として100 μg/mlからの2倍段階希釈になるよう調製する。

2. 薬剤感受性測定法

表3. 試験管法
〔高橋(國安, 佐藤), 1977に準拠〕¹⁵⁾

小試験管を用い、全量2 mlシステム	(ml/tube)
a) 液体培地	1.6 0
b) 薬剤液 (1,000 μg/mlから2倍 master dilutionしたもの)	0.2 1
c) 接種菌液, 10 ⁶ CFU/ml (*印10 ⁵ CFU/ml)	0.2 1*
d) 対照	
i) 薬剤無添加, 菌接種培養	1本/菌株
ii) pH 7.0又は7.2の培地	1本
(又はフェノール・レッドの標準色調表と比較)	
iii) 対照菌株を用いた感受性試験	
MG: KP-13株又は1RF株	
MS: WVU 1853株	
e) 栓: MG用には通気性のシリコ(スポンジ)栓, MS用には通気性のないゴム栓をする。	
f) 培養温度: 37℃	
g) 成績の判定(毎日朝夕観察)	
i) initial MIC: 薬剤無添加菌培養の対照が pH 6.8~7.0に黄変した時点で判定	
ii) final MIC: initial MIC判定時から3日後に判定する。但し必要に応じてその後も培養10~14日目迄観察する。	
h) 試験はduplicate以上行う。	

表2. *M. synoviae* 用培地 (Freyの培地)

A) 液体培地	
基礎培地: Mycoplasma broth base(Frey), dry-form(GIBCO)	
添加: 酢酸ナトリウム, 5%液	0.5%
フェノール・レッド, 0.2%液	1%
(マイクロタイター法の場合 2%)	
— pH 7.8, 滅菌冷却 —	
β-NAD, 1%液	1%
L-システイン塩酸塩, 1%液	1% 濾過滅菌
ブドウ糖, 50%液	2%
豚血清(非働化)	12%
ペニシリンGカリウム	1,000 U/ml
用途: 薬剤感受性測定用培地 (試験管法)	マイクロタイター法
接種菌培養, 希釈	
MG, MSの分離, 培養	
B) 寒天培地	
上記の培地にBacto-agar (Difco)を1.5%に添加	
用途: MS, MGのCFU測定	
• • の生残性試験	
• • のクローニング	
• • の薬剤感受性試験(平板希釈法)	

以下、薬剤感受性測定法の術式について述べるが、MGとMSについては主に培地と一部の項目を除けば相互に共通であるので、それらを一括して述べる。

A. 試験方法(ブイオン希釈法)

前述のとおり高橋ら(1977)¹⁵⁾の方法に準じたもので、その術式は表3に示すとおりである。試験管法には表3に示すように、培地・薬剤液・接種菌液のそれぞれについての分注方式が2通りあり、すなわち表3中に分注量を(ml/tube)で示した左側のそれぞれ1.6, 0.2, 0.2のシステムと、右側の0, 1, 1のシステムである。対照以下の事項についても表に示すとおりとする。

B. マイクロタイター法(微量ブイオン希釈

法)

培地は試験管法におけると同じである。

マイクロタイター法の術式は表4に示すとおりであり、薬剤液の希釈にマイクロダイリューターを用いる方法と、それを用いず、予めMaster dilutionを作ってこれを直接Wellに分注する2つの方法がある。またマイクロダイリューター法の場合、Senterfit(1983)¹⁴⁾は菌液を0.175 ml分注する方法を採用している。

表5. 寒天平板希釈法

表4. マイクロタイター法の術式

1. 薬剤液と菌液の分注

A. マイクロダイリューターを用いる場合

- 1) 所定の方法に従いマイクロダイリューターを用いて、プレート上に0.025 ml/Wellの薬剤の2倍希釈液列を作る。
- 2) 接種菌液: $10^{6\sim7}$ CFU/mlを各Wellに0.075 ml又は0.175 mlをマイクロピペットで分注。

B. マイクロダイリューターを使わない場合。

マイクロタイター・プレートの各Wellに下記のよりに滴下。

- 1) 薬剤液 (1,000 μ g/mlから
2倍master dilutionしたもの) 0.05 ml
- 2) 接種菌液: $10^{6\sim7}$ CFU/ml 0.05 ml
各菌株の元培養を小分けして-70℃に保存、試験当日朝、培地で10倍に希釈し、2時間35℃で培養したものをを用いる方法もある(Senterfit, 1983)。

2. プレートをプレートシーラーで被包圧着。
3. プレートをマイクロミキサーで振とう、Well内の液を混合。
4. 対照: 試験管法に準ずる。
5. 培養温度: 37℃
6. 成績の判定: テスト・リーディング・ミラーを用いて、試験管法に準じて行う。
7. 試験はduplicate以上行う。

1. 培地

MG用: 前述の=ワトリ PPLO培地(但し馬血清は10%添加=変法Barberの培地)

MS, MG兼用: 前述のFreyの培地

両者共に寒天培地にする時はBacto-agarを1.5%に添加する。

2. 薬剤希釈: 供試薬剤を滅菌精製水で希釈し、1,000 μ g/mlから培地で2倍希釈液列(master dilution)を作る。
3. 感受性測定用寒天平板の調製: 上述の寒天培地を溶解、冷却(56℃)、これに各薬剤希釈液を10%に加え、直径9cmのシャーレに10 mlずつ分注。十分に乾燥。
4. 接種用菌液: 前述の何れかの液体培地で接種菌を培養、培地色がオレンジ黄色(pH 7.2, 菌数 $10^{8\sim9}$ CFU/ml)になったもの(発育の悪い菌株では2~3代継代しておく)の 10^{-3} 希釈。
5. 菌接種: 菌接種装置(レプリケーター)を用い、3mm径のピンで約3 μ l ($10^{2\sim3}$ CFU)を試験用寒天平板上にスポットする。
6. 対照: 試験管法に準ずる。
7. 培養: 37℃, 5%CO₂大気中(CO₂フラン器、又はBBLガスバックCO₂用を用いる)。
8. 成績の判定: 培養3・5・7日に観察する。平板培地の発育集落を立体顕微鏡等で観察する。完全に菌発育が阻止された薬剤の最低濃度をMICとする。
微小集落は発育阻止とみなす。
薬剤無添加対照の発育に比べて、明らかに発育が抑制された濃度以上の高濃度の薬剤含有培地に2, 3の集落が認められることがあるが、それらは発育阻止とみなす。

C. 寒天平板希釈法

寒天平板希釈法の術式は表5に示すとおりである。

3. 実験成績の判定法

A. 試験管法及びマイクロタイター法のように液体培地を用いるMIO測定法の場合は、MG又はMSの増殖によりブドウ糖が分解されて酸が形成され、それによりpH指示薬として培地に加えられたフェノール・レッド(P.R.)が赤色(アルカリ性)から黄色(弱酸性)に変色する事をもってMG又はMSの増殖陽性とみなす。これは、一般細菌の液体培地におけるように、一般にマイコプラズマは増殖しても培地をほとんど混濁させず、培地の混濁ではマイコプラズマの発育が判定しにくいためである。もし培地が1夜で黄変したり、強い黄変混濁がみられた場合は普通寒天平板培地にその黄変した培地を接種して、一般細菌の混入の有無を確認するとよい。又同時にマイコプラズマの固型培地にその黄変した液体培地を滴下して5%CO₂, 37℃培養を行ってマイコプラズマ集落の発育を確認するとよい。黄変した液体培地をグラム染色して一般細菌の混入を確認するのも一法である。

そして、表3に示したように薬剤無添加菌接種対照培地で同一菌株が発育黄変した時に認められた薬剤添加培地でのMIO値をinitial MIOと呼ぶ。その後遅れて認められた最終的なMIOをfinal MIOと呼ぶ。マイコプラズマではinitial MIO判定の3日後に判定したMIO値を通常final MIOとするのがよいとされている。そして、一般にfinal MIOをMIOとしてあらわしている。なお、マイクロタイター法の判定にはテスト・リーディング・ミラーを用いるとよい。

B. 寒天平板培地希釈法でのMIOの判定は37℃, 5%CO₂培養でMG・MSの場合、

その集落の発育を実体顕微鏡や顕微鏡の弱拡大(4~40~100倍)で確認する。なお、集落を鏡検する前にDienesの液で寒天平板上の集落を染色する¹¹⁾。MG・MS共に一般に培養の3, 5, 7日後に成績を確認するとよい。3日では集落の発育が認められなくても、5日後には集落の発育が認められる場合が殆どである。この場合もinitial MIOとfinal MIOの考え方は液体培地の場合と同様である。この際、矮小集落の発育や極く少数の集落(2~3個)の発育は発育阻止とみなす。

なお何れの場合も、完全に菌発育が阻止された薬剤の最低濃度をもって最小発育阻止濃度(MIO)とし、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。

4. 補 遺

最後に、考察にかえてWhithear(1983)¹⁷⁾が鳥由来酸酵性マイコプラズマの微量ブイオン希釈法による薬剤感受性測定法の成績に影響する種々の潜在的要因についての系統的評価を行い、標準的方法を確立した報告の概要を紹介した。その要点は下記のとおりである。培地は変法Freyの培地²⁾を用いた。培地中の血清の濃度と由来動物種等は10~25%の間で殆ど影響しなかった。試験での接種菌数、培養期間、培地のpH等は成績に強く影響する。培地中の一般細菌発育阻止剤(ペニシリン、酢酸タリウム、アモキシシリン等)の存在や抗生物質の溶媒、供試菌の処代数などは成績に重要な影響を与えなかった。成績の判定は培地色がpH7.8の濃赤色からpH7.0のオレンジ黄色に変わった時点であるのがよい。これらの種々の要因をControlする事により、再現性に富む信頼度の高い標準的な薬剤感受性測定法を開発する事ができた。

なお、以上のような方法でえられた薬剤感受性試験の成績は、あくまで*in vitro*での成績であり、必ずしも*in vivo*での成績と平行する

ものではなく、薬剤効力の最終判定には適切な *in vivo* での判定が必要であることを忘れてはならない。

文 献

- 1) Freundt, E.A. (1983) Culture media for classic mycoplasmas. pp. 127-135. In: Methods in mycoplasmaology, Vol. I. (Razin, S., and Tully, J.G. eds.), Acad. Press, New York.
- 2) Frey, M.L. et al. (1968) A medium for the isolation of avian mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. 29: 2163-2171.
- 3) 原田良昭ほか (1984) 各地の種鶏群における *Mycoplasma gallisepticum* および *M. synoviae* の汚染実態と分離株の薬剤感受性。日獣会誌。37: 93-99.
- 4) 加藤和好, 小野島学 (1977) 種卵の *Mycoplasma synoviae* 検査成績。鶏病研報。197-198.
- 5) Kleven, S.H., and Anderson, D.P. (1971) In vitro activity of various antibiotics against *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis. 15: 551-557.
- 6) Lorian, V. (ed.) (1980) Antibiotics in laboratory medicine. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 7) 松井光蘭ほか (1967) *Mycoplasma gallisepticum* の抗生物質およびニトロフラン剤に対する試験管内での感受性。家畜衛試研究報告。第54号: 19-23.
- 8) 村田昌芳ほか (1980) 1969~1971年に分離された *Mycoplasma gallisepticum* の主な抗生物質感受性。J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ. 19: 55-68.
- 9) 村田昌芳ほか (1983) 1983年に分離された *Mycoplasma gallisepticum* の主な抗生物質感受性。家禽会誌。20: 400.
- 10) Newnham, A.G., and Ohu, H.P. (1965) An invitro comparison of the effect of some antibacterial, antifungal and antiprotozoal agents on various strains of *Mycoplasma* (pleuropneumonia-like organisms: P.P.L.O.). J. Hyg., Camb. 63: 1-23.
- 11) 日本細菌学会教育委員会 (編)。中村昌宏ほか (1982) ヒト・および植物マイコプラズマの分離と同定。細菌学技術叢書2。菜根出版。
- 12) Olson, N.O. (1978) *Mycoplasma synoviae* infection. pp. 261-270. In: Diseases of poultry, 7th ed. (Hofstad, M.S. et al. eds.), Iowa State Univ. Press, Ames.
- 13) 佐々木正五ほか (編) (1974) マイコプラズマ。講談社, 東京。
- 14) Senterfit, L.B. (1983) Antibiotic sensitivity testing of mycoplasmas. pp. 397-401. In: Methods in mycoplasmaology, Vol. II. (Tully, J.G., and Razin, S. eds.), Acad. Press, New York.
- 15) 高橋 勇 (1977) 抗菌剤の効力試験法。pp. 155-192. In: 動物用医薬品・飼料添加物, 新飼料の有用性評価法。(小華和忠ほか編), フジテクノシステム, 東京。
- 16) 高橋 勇 (1980) 鶏由来マイコプラズマの薬剤感受性と耐性について。家畜の耐性菌研究会報。第1号: 1-5.
- 17) Whithair, K.G. et al. (1983) Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics. Avian Dis. 27: 937-949.