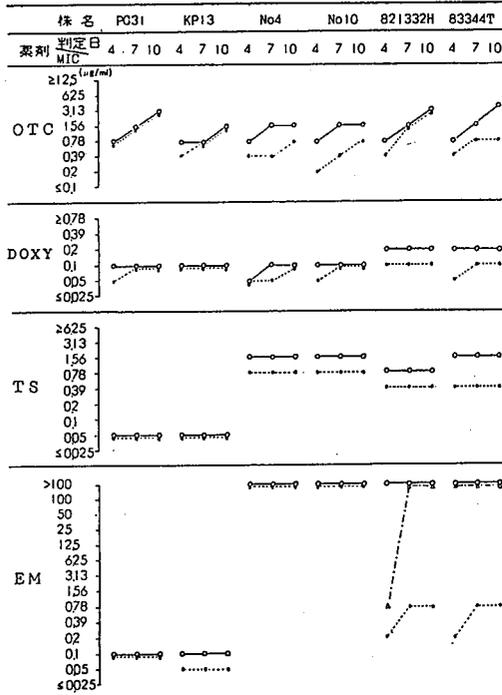


表2. *M. gallisepticum* のMICの変動(寒天法)



接種菌数: ○=10⁸, ▲=10⁷, ■=10⁶ CFU/ml 各0.003ml

以上の結果, 寒天法では接種菌数は10⁶ CFU/mlの菌液を0.003 ml(菌量で10³個)がパラツキが少なく, 10⁸および10⁷ CFU/mlの菌液接種よりも, 判定が容易だった。培養日数は4日で充分と判断されたが, 7日でのMICが液体法のFinal MICとほぼ一致した。Initial MICとFinal MICについてはさらに検討を要す。

文 献

- 1) 原田良昭ほか(1984) 日獣会誌, 37: 93~99.
- 2) 清水高正ほか(1983) 第95回日本獣医学会講演要旨, 166.
- 3) 高橋 勇(1977) 動物用医薬品・飼料添加物・新飼料の有用性評価法, 小華和忠ら編, 155-192, フジテクノシステム, 東京.

表3. 寒天法と液体法とのMICの比較(MG8株)

薬 剤	判 定 P ^a B ^b	MIC (µg/ml)								
		≤0.006	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	≥1.56
OTC	4 I					1	5	2		
	7 F					1	5	2		
DOXY	4 I		1	4	3					
	7 F		2	4	2					
TS	4 I			4	8					
	7 F			4	4					
OM	4 I					2	6	4	2	
	7 F					1	1	3	4	

^a P: 寒天法(4日, 7日目判定)
^b B: 液体法(I: initialMIC, F: finalMIC)

総 合 討 論 (座 長 : 佐藤静夫・家衛試)

(座長:)以上4名の発表により, およそ宿 題に対する答えがたよりに思う。おおすじで

は村田氏の話しにもあったように、*M. gallisepticum*を例とした抗菌剤研究会の試案で、ほぼよいという結果がでたものと思う。まだ、検討課題の一つである試験実施時に使用する接種菌株の保存をどうするかという点については、DMSOを用いることにより、*Mycoplasma*ではあらかじめ調製しておくことができるという二人の演者の成績が一致しており、そう問題はないように思う。しかし最も大きな問題点は、寒天法の成績判定のさいに（発育阻止限界付近における）少数集落の出現とか、発育が非常に悪いものをどう扱うかということで、これは*Mycoplasma*の種類によって、若干差があるように思う。特に山本氏におききたいが、他の演者は、以上のような場合、（発育）阻止と（判定）した方がよいだろうという提案であるが、豚の*Mycoplasma*では、（発育として）とった方がよいとお考えなのか。

（答：山本孝史・東大） 大変むずかしい問題である。*M. hyopneumoniae*では、液体法しかなできないから問題はないが、*M. hyorhinis*と*M. hyosynoviae*の場合には、液体法と寒天法の成績が一致するという意味では、（少数集落の発育や非常に弱い発育も）非阻止とみなした方がよいように思うが、それ以上のことはいえない。

（座長） 山本氏の示した写真（豚由来）と清水氏（牛など由来）、内田氏（鶏由来）のを比較して、（発育阻止限界付近の）豚の*Mycoplasma*の集落の方が、形態的にはっきりしたもののように思うが、そのあたりを山本氏はどうお考えか。

（答：山本孝史）（他の演者が示したものは）豚の（*Mycoplasma*の集落）と若干異なる。清水氏と私の場合とでは、同じものを言っているのではないように思う。ただし、矮小集落で、少数の場合には阻止とみなしている。私の場合には発育した集落を継代すると、発育してくる。

おそらく菌種のちがいのか（と思う）。清水氏の示したようなものはでなかった。

（座長） この点については、他の人も検討していただく必要がある。

（意見：山本孝史） 同意見である。

（座長） 今お聞きの通り、今回のシンポジウムで、他の（*Mycoplasma*の）場合には、ほぼ同様の（判定法で）表現できると思うが、豚の*Mycoplasma*の判定（の問題点）については、先ほどの（問題となった）点を（考慮に）含めて実施し、山本氏の指摘の点は採用した方がよいというのが、現時点の状況である。われわれの小委員会としても、その点を割切れなかった（基準に盛り込めなかった）点が残ったが、今後検討していただきたいと思う。なお、この点に関して、（発育阻止限界付近で発育した集落を）継代して発育するか否か（という点）を確認するようにすれば、判定法として使えるように思う。この点、清水氏の場合には、（継代しても）発育してこないということなので、そのあたりを、他の薬剤、その種類との関係もあろうが、を含めて、今後実験していただくとよいと思う。

その他、特に技術的な問題について、例えば、pHとか培地の問題についてご意見がないか。

（意見：跡部ヒサエ・東大） 平板希釈法で村田氏が示された接種機械（ミクロプランター）は、沢山の株を処理する時に都合がよいと思う。

（座長） 今後当研究会としても、追加を考えたい。

（意見：橋本和典・家衛試） 村田氏の講演では基準株のことがでたが、山本、清水氏の講演中にはでてこなかったように思う。私が先に清水氏の講演に追加発言した、CTOの問題などを含め、薬剤濃度、希釈をチェックするためにはこういうシリーズ参照株あるいは基準株（ブドウ球菌の209Pのような）をおく方がよいと思うが、その点はどうか。

(座長) その点について清水氏のご意見は？

(答：清水高正・宮崎大) (マイク不使用のため録音不良)，(大意：多数の株を実験するときには、先に表3の*印で示したように、基準株をおくようにしている)。

(座長) 山本氏の場合はどうか。

(答：山本孝史) 私どもも同様に各試験ごとと *M. hyopneumoniae* , *M. hyosinoviae* の場合とも基準株をおいて、成績にブレがないことを確認している。

(座長) 将来、当研究会として基準株を必要とした場合に、株の分与の問題が生じてくる。今回講演された3氏から分与してもらうことにするかどうか、事務局の高橋氏から伺いたい。

(答：高橋 勇・日猷大) 基準株は、本来ならば、当研究会の事務局で保管・分与すればよいのであるが、事務局で保管・維持するのは、人手やその他の関係で困難である。それぞれの専門に扱っている先生方のところで分与していただく方がよいと思う。先にあがった各基準株を登録の型とし、必要な人は各先生方のところへ直接分与を申込むか、あるいは事務局を通じて各先生の所へ連絡し分与という型をとるかは、後に協議したい。

(発言：橋本和典) この点は、皆の同意があり、また各先生方から基準株の指定があったならば、動物用生物学的製剤協会のような機関を通じて分与するようにしたらいと思う。

(発言：村田昌芳・広島大) 同様の意見である。もう一つ別の意見として、こういう場合、私が講演の最後にいったように、日本で生体内実験に使われている株(を基準株としてとりあげる)という考えが必要だと思ふ。

(座長) その点も配慮に加えたい。

(質問：末永 格・武田薬品) 山本氏の話の中で *M. hyopneumoniae* の場合に、マイクロブ

レートでフラットなものを使ったといわれたが、何か理由があるのか。

(答：山本孝史) ご承知のように、この菌は、大変増殖(の条件)がむづかしいものに入ると思う。そこで継代がすすんだ菌株を使う場合はよいが、新鮮分離株をクローニング後にすぐ使う場合には、試験管での培養が一番よく増殖する。ところがマイクロプレートだと、気層が少いためと思われるが、増殖がわるい。そこでフラットのプレートを用いると上はかなり気層があくので、増殖がよい、という点からこれを使用している。ただ問題点は、シールがピシッとできないので、2週間以上の観察は、液が減少してしまうため無理だという欠点がある。

(座長) 本日は各先生方のご協力により、種々の点についてご意見を伺い、当研究会として、各種の *Mycoplasma* について、こういう方法で行えばよい、という一応の基準ができたものと感謝する。

(座長付記) 今回のシンポジウムにおいて担当委員によって、講演ないし追加発言として発表された結果は、全般的には、すでに当小委員会のメンバーの1人である高橋氏によって試案として提出されている「*M. gallisepticum* に対する薬剤感受性検査法」の手法を応用し得ることが認められた。しかし、多種類のMpやUpに應用する前提として、培地、接種菌数および判定方法などについてみると、必しも一定化できない点もあることが明らかにされた。

培地： 各種のMpやUpの薬剤感受性の検査には種々な培地が使用されているので、一般細菌のように、検査用培地の標準化を検討した。鳥類、犬、牛由来のMpやUpには、牧江らの処方による榮研試作培地として使用し得るが、豚由来の代表的な3種のMpでは、発育が悪く、従来の培地と置換できないことが認められた。

接種菌数： MpとUpの薬剤感受性測定結果

は、接種菌数によってかなり変動するので、MICの比較は、一定の菌数の範囲で行なわれた成績でのみ可能である。検討の結果、Mpでは寒天平板法で 10^5 CFU/mlを約 $10\ \mu\text{l}$ (約1,000 CFU)、液体培地では $10^4 \sim 10^6$ CFU (またはCCU)、Mpの場合は $10^3 \sim 10^4$ CCUとすることが必要と認められた。また、菌数既知の接種菌液を用いるためMpとUpの冷凍保存法を検討した結果、Mpでは10%にDMSOを添加した場合、 -70°C 以下で、少くとも2箇月間は安定であること、UpではDMSO無添加でも凍結保存し得ることが明らかにされた。

MICの判定： Mpの液体培地法では、initial MIC (対照が発育した時点) 観察後

3日目にfinal MICを、また、Upは培養3日後にMICを判定すると再現性が高い。寒天法では、一般に矮小集落や小数(2~3個)の集落発現は発育阻止とみなした場合、液体法の結果と良く一致する。しかし、豚由来Mpの矮小集落は、継代可能なので、発育陽性と判定されている。この場合の矮小集落は、形態的に他の動物由来Mpのそれとは異なるようで、なお、今後の検討を要する。

基準菌株： 基準菌株の設定は、必要性が認められるが、菌株の指定ならびに分与方法などについて具体的に検討したい。菌株分与は動物生協の菌株センターなどで取扱われることが望ましい。