

特集 I マイコプラズマの薬剤感受性測定法の検討*

はじめに

佐藤 静夫 (マイコプラズマの薬剤感受性測定法検討小委員会委員長)

標題の件について、今回シンポジウムが企画された経緯は次の通りである。すなわち、この問題に関して小委員会(メンバーは後記)を昭和56年に結成し、昨年までの3年間にわたり、検討を重ねた。その結果を一括して今回、三人の方に代表して発表願うことにした次第である。

その目的とした点は、当委員会のメンバーの高橋(日獣大)により、すでに印刷物(本誌P.18の村田論文の文献15)参照)に発表されている、*M. gallisepticum*の薬剤感受性測定法(試案)が、はたしてその他の鶏由来の *mycoplasma* (以下Mp.) や豚、牛由来のMpおよび *Ureaplasma* (以下Up.) にもそのまま適用してよいかどうか、修正点がないかということを明らかにするため、小委員会で検討を重ねた。その中で問題点としてあがってきたのは、①接種菌量をどの程度とすべきか、②培地として何を用いるのが適当か、③M I Oの判定法をどうするかの3点で、特に③が最も大きな問題と考えられた。

三年間の検討の結論として、各菌種それぞれに問題点があり、各種のMpあるいはUpについて、一つの方法でやるのは無理であろうという空気であり、各演者の発表を伺った上で参会者からの意見も加えて、当研究会としてまとめたい、という主旨である。

[注:小委員会のメンバー] 佐藤静夫、橋本和典、国安主税(以上家衛試)、山本孝史、跡部ヒサエ(以上東大)、村田昌芳(広島大)、清水高正(宮崎大)、高橋 勇(日獣大)。(順不同)

1. 2, 3の動物由来マイコプラズマおよびウレアプラズマの薬剤感受性測定法について

清水 高正¹⁾ 永友 寛司¹⁾ 末石 哲之²⁾ 村川 泰司³⁾
(¹⁾宮崎大, ²⁾塩野義製薬, ³⁾化血研)

A Test for the Measurement of Drug Sensitivity of Mycoplasmas and Ureaplasmas from Animals

Takamasa SHIMIZU, Hiroshi NAGATOMO (Miyazaki Univ.),
Tetsuyuki SUEISHI (Shionogi Pharm. Co., Ltd.) and
Taiji MURAKAWA (Chemo-Sero Therap. Inst.)

緒 言 M)を対象とする薬剤感受性試験の標準法が確
マイコプラズマ(*Mycoplasmales*, 以下 立されていないため、研究者により独自の方式

* 昭和59年4月9日開催の第11回シンポジウムの要旨。特集IIも同じ。

式が採用されているのが現状である。⁵⁾ その結果、同一の参考株に対する同じ薬剤による最小発育阻止濃度 (MIC) が、研究者間で数10倍もの差を呈する報告が見られるようになり、Mの薬剤感受性試験法の標準化を求める声が高まるに至った。Mに対する薬剤のMICの変動要因を報じた文献は残念ながら極めて限られているため、ここではわれわれが牛由来Mを主体に検討したMICの変動要因が話題の中心にならざるを得ないので、あらかじめ御寛容を願いたい。

供試材料と方法

1) マイコプラズマ株：基礎実験に供用した *Mycoplasma* 属 (以下M属) 11株と *Acholeplasma laidlawii* PG 8株の由来及び分解基質は表1に示す。また、牛由来 *Ureaplasma diversum* (以下Ud) 13株の名称は、図1に記したとおりで、うち9株は子牛の肺炎、4株は生殖器からの分離株である。これらの他に、*M. bovis* 50株、*M. gallisepticum* (Mg) 82株、Ud 50株を供用し、一定条件下で数

種の薬剤に対する感受性を調べた。

2) 薬剤：基礎実験はSP, DOTC, TM, TSの4剤を用いて行い、MICの分布の検査にはJM, EM, OMを加えた。

3) 培地：液体培地はPPL0ブイヨン (Difco) 70容に馬血清15容、25%新鮮イーストエキス10容、1%フェノールレッド0.2容を加えた変法Hayflick培地を使用し、供試株によりグルコース(0.5%)、L-アルギニン(1%)、TTC(0.05%；この場合は指示薬は除く)、または尿素(0.1%)を基質として添加して、Ud用培地はpHを6.2、その他の場合は7.2±0.1に修正し使用した。固型培地はPPL0寒天培地(Difco)に馬血清15%、イーストエキス10%を添加したものをを用いた。

4) MIC測定法：DOTCは直接純末から、また他の薬剤は2~4mg/ml(力価)のメタノール溶液を作成後、それぞれ1000μg/ml(力価)の水溶液を作成した。固型培地に添加する際は、滅菌蒸留水で2倍段階希釈系列を作成し、培地9容に対して1容の薬剤希釈液を添

表1. 基礎実験供用株の分解基質と由来

種・株名	分解基質	由来
<i>M. bovirhinis</i> PG43*	グルコース	牛 鼻 腔
<i>M. bovirhinis</i> BP19	グルコース	子牛肺炎
<i>M. bovirhinis</i> SN1	グルコース	子牛肺炎
<i>M. bovis</i> 22-1	T. T. O	牛乳房炎
<i>M. meleagridis</i> TK1	アルギニン	七面鳥気嚢炎
<i>M. spumans</i> PG13*	グルコース	犬
<i>M. maculosum</i> PG15*	アルギニン	犬
<i>M. arginini</i> ASO1	アルギニン	牛乳房炎
<i>M. columbinum</i> MMP1	アルギニン	ハト気管
<i>M. columborale</i> MMP4	グルコース	ハト口腔
M. sp. SN20	T. T. O	子牛肺炎
<i>A. laidlawii</i> PG8*	グルコース	下 水

*印はNCTC由来で、尾形学教授(東大：当時)から分与されたもの。

加し、平板に固めて乾燥させた後、供試菌液をマイクロピペットで5~10 μ l, またはドロップパーで25 μ lずつ接種した。液体培地法の場合は、培地で5倍に希釈して200 μ g/mlの薬剤濃度を作成後、培地を用いて2倍希釈系列を作り、試験管法の場合は薬剤希釈液1ml, マイクロプレート法(MP法)の場合は50 μ lに対し、あらかじめ新鮮培地で種々の菌数に希釈した供試菌液を同量ずつ添加し、試験管法ではゴム栓を、またMP法の場合はプレートシールで密閉を施して培養に供した。

5) 培養・観察: 培養は37℃の好気条件下で行い、いずれの場合にも7日間にわたり毎日、集落の発育(40倍率の顕微鏡使用), pHの

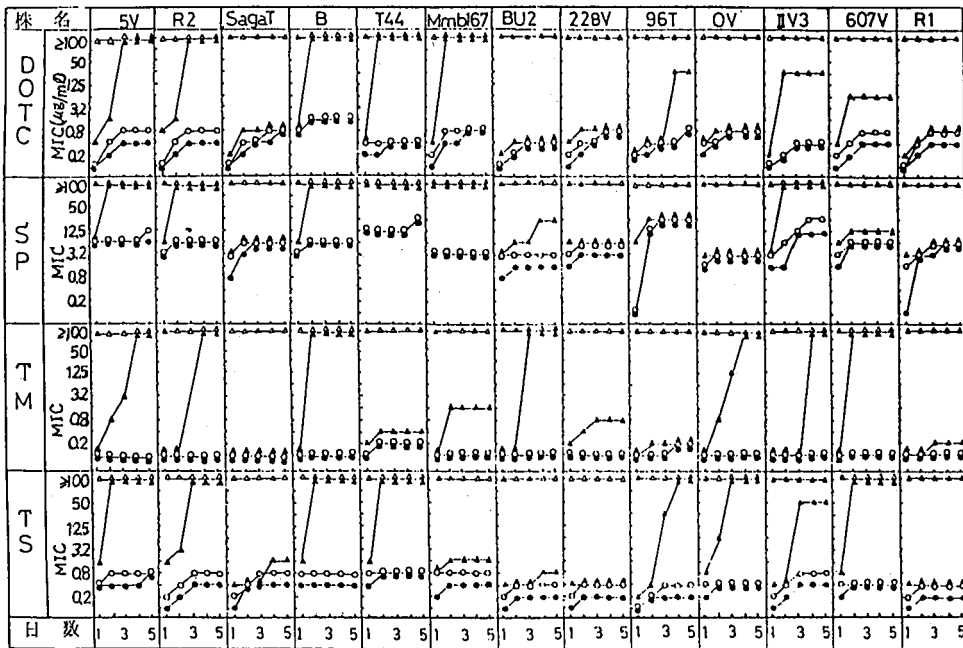
変化, あるいはTTC還元による赤色沈澱の出現の有無を観察・記録した。

6) 検討事項: 実験成績の項目に述べる事項を検討した。

結果と考察

1) 接種菌数によるMICの変動

M属とPG8株の計12株につき, 10^4 , 10^5 , 10^6 /mlの集落形成単位(CFU)の接種菌数を用いて、平板法で検査した場合のMICの変動は、培養日数の如何をとわず、いずれの薬剤も菌数の増加に従いMICが4倍以上の上昇を呈する例が1, 2株ずつ認められた⁵⁾。同じ接種菌数を用いた液体法では、MIC



Δ - Δ : 10^6 , \blacktriangle - \blacktriangle : 10^5 , \circ - \circ : 10^4 , \bullet - \bullet : 10^3 CCU/ml

図1. 13株の*U. diversum*に対する4種の薬剤のMICに及ぼす接種菌数と培養日数の影響

の変動は前者より少なかった。これに対し、13株の *Ud* の液体法による試験では、図1に示すように接種菌数によるMICの差が極めて著明であった。これらの結果から、*Ud* のMIC測定時の接種菌濃度は、 10^4 /ml以下の色変単位 (CCU) とするのが必須条件と思われる。

2) 培養日数によるMICの変動

液体培地法の場合、培養日数が増すとMIC

の値が上昇する事実は、一般細菌の場合同様MICについても観察されている^{1,2,3,6})。今回、3段階の希釈菌液を用いた検査の結果も、判定時期によるMICの差がかなり著明で、例として 10^5 CFU/mlを接種菌数とした場合のMICの日別変動を示すと、表2のとおりである。4剤とも、培養1日後の初期MICの4倍以上のMICを呈した例数が3日目で最高に達したが、

表2. 培養日数によるMICの変動例[§]

方法	供試株数	培養日数	薬 剤			
			SP	DOTC	TM	TS
液体培地法	8	2	4*	6	2	0
		3	7	7	6	1
		4	7	8	6	1
		5	7	8	6	1
平板法	12	4	0	0	0	0
		7	2	3	0	0

§ : 接種菌数はいずれも 10^5 CFU/ml

* : 液体培地法では1日目、平板法では2日培養後の初期

MICに対し、4倍以上のMICの上昇を呈した株数累計。

TSではMICの上昇を示した株数が著しく少なかった。

平板法では、判定日数に伴うMICの変動は少なく(表2)、菌数を 10^4 または 10^6 /mlにした場合のMIC値も、日別変動が少なかった。

Ud の場合は図1に例示したように、接種単位が 10^5 CCU/ml以上の場合の日別変動の幅及び変動期間がかなり大きいのにに対し、接種単位を少くした場合のMICはかなり安定していた。菌液の希釈によるこのような著差は、*Ud* の増殖環がM属や細菌に比べて極めて短いこと(図2)や、遊離ウレアーゼの作用などが考えられる。

3) 矮小異型集落の判定

平板法の場合、不規則に出現する種々の形状の異型集落を、発育阻止と認めるか否かによりMIC値に8ないし32倍の差を生む。液体法によるMICとの相関性や、これらの異型集落を新鮮培地に移植した場合発育しない点を勘案すると、これらは発育阻止と判定するのが適当と思われる⁵)。

4) 基礎培地の差による影響

13株の*Ud* を用い、牧江ら⁴) の処方による栄研試作培地3ロットを基礎培地として、前記のDifco製培地と比較したところ、4剤ともほとんど差のないMIC値を示した。

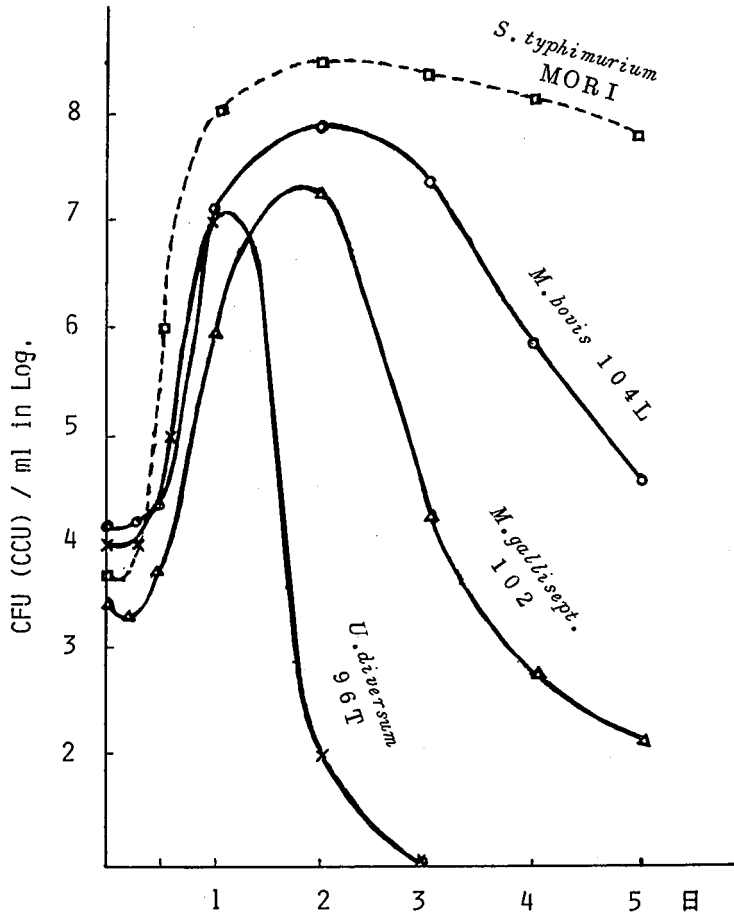


図2. マイコプラズマ、ウレアプラズマ及びサルモネラの増殖曲線

5) 供試菌液の凍結保存時のDMSO添加の影響

前記のとおり、いずれの方法を用いる場合にも、接種菌数の規制が重要な条件になるため、MIOの測定に先立って菌数を計数しその間培養液を凍結保存するか、あるいは各株の新鮮培養液の数希釈系列を供用し、同時に菌数の測定を行うかのいずれかが必要である。凍結保存法

をとる場合の生存性を、5種のM属各2株ずつと、Ud 13株を用いて検討した。各培養液は10%にdimethyl sulfoxide (DMSO)を添加または無添加の新鮮培地で10倍に希釈し、小管に分注後-70℃に凍結し、1週ごとに1管ずつ37℃で急速融解してCFU (CCU)を計測した。各種1株ずつの生存性を示すと図3のとおりで、*M. bovirhinis*では2株とも

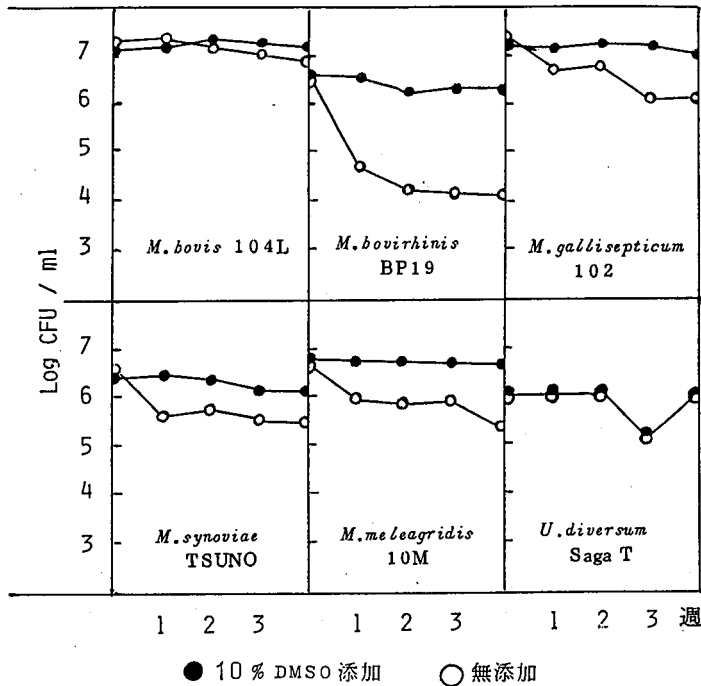


図3. 数種のマイコプラズマの凍結保存に及ぼすDMSOの影響

DMSO無添加の場合、凍結1週後の生存率は凍結前の1%程度に減少し、*M. bovis*以外のM属も生存数の低下が見られたが、DMSO添加により4週後も10%以上の生存率を示した。一方*Ud*は13株とも、DMSOの添加なしに高度の生存数を保持することが判明した。

また、DMSO添加凍結菌液と新鮮菌液の間には、4種の薬剤によるMICの値に差がなかった。

6) その他の条件

平板法の際の接種菌液量は、5 μ lでも25 μ lでもMICには差がなかった。また、液体法は試験管法及びMP法によるMICの値が良く一致した。

7) Mの薬剤感受性試験時の条件について

以上の結果から、Mに対する薬剤のMICの変動を抑える条件として、次の事項が考えられる。

① 平板法によるMIC測定：供試菌液濃度は 10^5 CFU/mlとし、この5~10 μ lを接種す

る。判定は3~5日後に行い、異型集落は発育阻止と判定する。

② 液体培地法によるMIC測定：所定の基質を含む新鮮培地で供試菌の濃度を $10^3 \sim 10^4$ CFU (またはCCU)に調整したもの1容と、同じ新鮮培地で2倍段階希釈を行った薬液1容を混合し、M属は高橋⁶⁾の提案どおり初期MIC観察後3日目、*Ud*は培養供試3日後に判定する。

③ 供試菌液を-70℃以下に凍結保存する際、*Ud*は特にDMSOを添加する必要はないが、M属にはこれを10%の割合で添加するのが安全である。

参考として、*M. bovis* 50株と*Mg* 82株に対するMICを①の条件で、また*Ud* 50株のMICを②の条件(MP法)で求めた結果を表3に示す。

表 3. 数種の薬剤の *M. bovis*, *M. gallisepticum*, *U. diversum* に対する MIC の分布

種名 (株数)	薬剤	MIC (μg/ml)										
		0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100
<i>M. bovis</i> (50 + *株)	T M	22	28*									
	T S	9*	31	5	3	1	1					
	S P		6	28*	16							
	J M		8	33	9							
	E H								14	35*	1	
	O M								7	25*	18	
<i>M. gallisepticum</i> (82 + *株)	T M	69*	9	4								
	T S	2*	2	3	7	5	1	13	26	16	7	
	S P		3	4*	8	3	2				62	
	J M	2*	4	5	2	3	3	1			62	
	E H			3*	5	7	5				62	
	O M				2	4*	7	7			62	
<i>U. diversum</i> (50 株)	T M	17	28	4	1							
	T S	13	20	12		2	1	2				
	S P					1	1	11	22	6	4	
	DOTC	13	12	24	1						5	

* : 基準株 (*M. bovis* : Donetta 株, *M. gallisepticum* : PG 31 株) を示す。

謝 辞

供用薬剤純末を分与していただいた武田薬品工業KK, 台糖フェイザーKK, 三共製薬KK, 東洋醸造KK, 山之内製薬KKの関係各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Allan, E.M. and Pirie, H.M. (1981) Res. Vet. Sci. 31:174-176.
- 2) Hinz, K.H. (1980) Dtsch. Tierarztl. Wschr. 87:220-223.
- 3) Kishima, M. and Hashimoto, K. (1979) Res. Vet. Sci. 27:218-222.
- 4) 牧江弘孝・田村 豊・田中正三 (1979) 動薬検年報, No 16:21-29.
- 5) 清水高正・末石哲之・永友寛司 (1981) 官大農研究報告 28:119-127.
- 6) 高橋 勇 (1980) 家畜の耐性菌研究会報, No 1:1-5.

(追加発言 : 橋本和典・家衛試)

私は、清水氏と同様に第6回(54年)の本会シンポジウムで、牛の生殖器と呼吸器病由来

の *Mycoplasma* と *Ureaplasma* の薬剤感受性成績を述べた。そのときの成績で最も問題であっ

たのは、清水氏の指適と同様に①接種菌量（をどれくらいにするか）、②平板法における（異型）コロニーの判定（をどうするか）、③マイクロプレート法での Initial MIC（IM）と Final MIC（FM）との差（をどう扱うか）、の3点であった。

その際に、接種菌量を維持するため、DMSO（を加えて凍結保存する方法）の問題についても言及したが、委員会の討議や今回の清水氏の

発表で、この点が解決されたと思う。ただ、まだ問題点として残るのは、IMとFMの（ちがいが生ずる）場合に、薬剤の種類によって、例えばOTCのように、感作期間中に著しく薬剤の力価が低下がおこるといふことがある。その他の若干の薬剤にも（同様の問題が）あるが、薬剤個々について感作期間中の安定性を含めて、問題としてとらえる必要がある。