

## 2. 豚由来マイコプラズマのMIC測定法に関する検討

山本 孝史 ・ 跡部 ヒサエ (東京大学)

### Factors Influencing the Minimal Inhibitory Concentrations of Antibiotics for Porcin Mycoplasma

Koshi YAMAMOTO and Hisae ATOBE

Division of Animal Research, University of Tokyo

私どもの課題は、豚由来マイコプラズマ(以下M)のMIC測定法に関する検討であり、特にアルギニン分解性のMについても検討を加えるようにということであった。そこで、ブドウ糖分解性のMとしては、主として*M. hyopneumoniae*を、アルギニン分解性のMとしては、*M. hyosynoviae*を用いて以下の点につき検討を加えた。

1) 栄研培地使用の可否。2) 接種菌数の検討。3) 寒天希釈法における微小集落および少数集落の取扱い。4) DMSO添加凍結保存菌液使用の可否。5) Initial MICおよびFinal MICの判定時間について。

#### 材料および方法

供試菌株：*M. hyopneumoniae*は、新基準Jの他、肺炎病巣部より分離され20代以上継代されたもの、および10代以内のもの各々10株を供試した。*M. hyosynoviae*は、基準株S16の他、関節炎罹患豚の関節腔液より分離され、継代数10代以内の7株を用いた。また栄研O培地の検討および寒天希釈法における微小集落の取扱いに関する検討では、これらに加えて、*M. hyorhinis* BTS7(基準株)の他、肺炎病巣部より分離され、継代数10代以内の*M. hyosynoviae* 9株および*M. hyorhinis* 10株もあわせて供試した。

供試培地：*M. hyopneumoniae*のMIC測定にはBHL-Brothをまた*M. hyosynoviae*には、mA-Brothおよびm-Agarを用いた(表1)。

Table 1. Constituents of the medium employed for MIC determination

BHL-Broth modified for MIC determination	
BHL Basal Medium*	750 ml
0.4% Phenol red solution	5 ml
Swine serum	100 ml
Horse serum	100 ml
25% Fresh yeast extract pH 7.8 with 5% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	50 ml
* BHL Basal Medium	
Brucella broth (Gibco)	11.6 g
Lactalbumin hydrolysate (NBC)	4.0 g
Stock salt solution (x10)**	100 ml
Distilled water	1,400 ml
** Stock salt solution	
NaCl	80.0 g
KCl	4.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	1.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g
Glucose	20.0 g
0.4% Phenol red solution	50.0 ml
Make up to 1,000 ml with distilled water.	
mA-Broth modified for MIC determination	
PFLO Broth (Difco)	21 g
Mucin Bacteriological (Difco)	5 g
L-Arginine	5 g
0.4% Phenol red solution	10 ml
Distilled water	800 ml
Horse serum	150 ml
25% Yeast extract pH 6.5-6.8 with 1N HCl	50 ml
m-Agar	
PFLO Broth (Difco)	21 g
Mucin Bacteriological (Difco)	5 g
Agar granulated (BBL)	12 g
Distilled water	800 ml
Horse serum	150 ml
25% Yeast extract pH 7.5	50 ml

また一部の試験では、栄研O培地との比較を実施した。

供試薬剤：本研究においては、実用上最も使用頻度の多いと考えられるテトラサイクリン系薬剤およびマクロライド系薬剤の中からオキシテトラサイクリンおよびタイロシンをそれぞれの代表薬剤として選び、それぞれの標準薬剤を農水省動物医薬品検査所より分与を受け供試した。

凍結保存菌液の調製：*M. hyopneumoniae*は

BHL-Brothで3～5日培養後、20%にDMSOを含む同培地と等量混合後-70℃に保存した。また*M. hyosynoviae*は、アルギニンとフェノールレッドを除いたm-A-Brothで1～2日培養後、20%にDMSOを含む同培地と等量混合後、-70℃に保存した。

試験方法：栄研培地使用の可否（供試菌種*M. hyosynoviae*および*M. hyorhinis*）、および寒天希釈法における矮小集落および少数集落の取扱いに関する検討（供試菌種*M. hyosynoviae*）は、寒天平板希釈法によったが、その他の項目に関する検討は、液体培地希釈法によった。寒天平板希釈法では栄研C培地およびm-Agarを用い、常法にしたがい実施した。また液体培地希釈法では、*M. hyopneumoniae*は、平底プレートを用い、*M. hyosynoviae*はUプレートを用い、薬剤および菌液の希釈は、試験管内で実施し、各0.1 mlをドロッパーを用いてプレートの各ウェルに移した。平底プレートは、蓋と本体をビニールテープでまたUプレートは、本体上面を直接プレートシーラーで密閉した後、37℃で培養した。

### 実験成績

**栄研C培地使用の可否：**本培地においては*M. hyopneumoniae*のみならず*M. hyorhinis*も著しく発育が悪く、MICの測定は不可能であった。また*M. hyosynoviae*は、MICの測定が可能な程度には発育するが、m-Agarに比べると明らかに劣り、MIC値近辺で判定に困難を感じるが多かった。

**接種菌数の検討：**新鮮培養菌および凍結保存菌を用い、各種接種菌量がMICに及ぼす影響をみたのが表2～4である。これらの表から明らかなように、*M. hyopneumoniae*（表4）ではほとんど差は認められなかったが、*M. hyosynoviae*（表2,3）では、Initial MICにおいて2～8倍の差が認められた。しかしなが

Table 2(1) Influence of inoculum dose on MIC values of oxytetracycline for *Mycoplasma hyosynoviae*

Strain	Dose of inoculum (CFU/ml)	Initial MIC	1 day after	2 days after	3 days after	4 days after
S16	3x10 <sup>7</sup>	0.8	1.6	3.2	6.3	>6.3
	Fresh 3x10 <sup>6</sup>	0.2	0.8	1.6	3.2	6.3
	3x10 <sup>5</sup>	0.1	0.8	1.6	3.2	6.3
	Culture 3x10 <sup>4</sup>	0.4	0.8	1.6	3.2	3.2
S16	Freezed 1x10 <sup>7</sup>	0.4	1.6	3.2	6.3	>6.3
	1x10 <sup>6</sup>	0.2	1.6	3.2	6.3	>6.3
	Culture 1x10 <sup>5</sup>	0.2	0.8	1.6	3.2	6.3
FA06	1x10 <sup>7</sup>	0.8	1.6	3.2	>6.3	>6.3
	Fresh 1x10 <sup>6</sup>	0.4	0.8	1.6	6.3	>6.3
	Culture 1x10 <sup>5</sup>	1.6	3.2	6.3	6.3	6.3
FA06	1x10 <sup>7</sup>	0.8	1.6	3.2	6.3	>6.3
	Freezed 1x10 <sup>6</sup>	0.8	3.2	6.3	6.3	6.3
	Culture 1x10 <sup>5</sup>	0.4	1.6	3.2	3.2	6.3
FA07	3x10 <sup>6</sup>	3.2	3.2	6.3	6.3	>6.3
	Fresh 3x10 <sup>5</sup>	1.6	3.2	6.3	6.3	>6.3
	3x10 <sup>4</sup>	1.6	3.2	6.3	>6.3	>6.3
	Culture 3x10 <sup>3</sup>	1.6	3.2	6.3	>6.3	>6.3
FA07	3x10 <sup>5</sup>	1.6	3.2	6.3	6.3	>6.3
	Freezed 3x10 <sup>4</sup>	1.6	3.2	6.3	>6.3	>6.3
	Culture 3x10 <sup>3</sup>	0.8	1.6	3.2	6.3	>6.3
FA09	4x10 <sup>7</sup>	1.6	3.2	6.3	6.3	>6.3
	Fresh 4x10 <sup>6</sup>	0.4	3.2	6.3	>6.3	>6.3
	4x10 <sup>5</sup>	0.8	3.2	6.3	>6.3	>6.3
	Culture 4x10 <sup>4</sup>	1.6	3.2	3.2	6.3	6.3
FA09	3x10 <sup>7</sup>	1.6	3.2	6.3	6.3	>6.3
	Freezed 3x10 <sup>6</sup>	0.8	3.2	6.3	6.3	>6.3
	3x10 <sup>5</sup>	0.2	0.8	3.2	6.3	6.3
	Culture 3x10 <sup>4</sup>	0.8	1.6	3.2	6.3	6.3

ら、接種菌量が増加するにつれてMIC値が高くなるといった傾向は示さず、また、Initial MIC判定の翌日ではその差は2倍以内であった。

**寒天希釈法における矮小集落および少数集落の取扱い：***M. hyopneumoniae*は、寒天培地における発育が、液体培地のそれよりも著しく劣りまた不定であり、寒天培地におけるMICの測定は不能であったので、*M. hyosynoviae*についてのみ実施した。ここでいう矮小集落とは、薬剤無添加の菌液対照と比較して著しく微小な集落を指し、少数集落とは、集落形態は、薬剤無添加の菌液対照に比してさして変わらないが、集落数が数個の場合を指している、供試した17株の各種接種菌量（10<sup>4</sup>～10<sup>7</sup> CFU/ml）

Table 2(2) Influence of inoculum dose on MIC values of oxytetracycline for *Mycoplasma hyosynoviae*

Strain	Dose of inoculum (CFU/ml)	Initial MIC	1 day after	2 days after	3 days after	4 days after
FA10	5x10 <sup>6</sup>	3.2	6.3	6.3	6.3	>6.3
Fresh	5x10 <sup>5</sup>	1.6	3.2	6.3	>6.3	>6.3
Culture	5x10 <sup>4</sup>	3.2	6.3	>6.3	>6.3	>6.3
	5x10 <sup>3</sup>	0.8	3.2	>6.3	>6.3	>6.3
FA10	4x10 <sup>6</sup>	1.6	3.2	3.2	6.3	>6.3
Freezed	4x10 <sup>5</sup>	0.4	1.6	3.2	6.3	6.3
Culture	4x10 <sup>4</sup>	0.8	3.2	6.3	>6.3	>6.3
	4x10 <sup>3</sup>	0.8	1.6	6.3	>6.3	>6.3
FA12	2x10 <sup>7</sup>	0.4	1.6	1.6	6.3	>6.3
Fresh	2x10 <sup>6</sup>	0.8	1.6	6.3	>6.3	>6.3
Culture	2x10 <sup>5</sup>	0.2	0.8	3.2	6.3	>6.3
	2x10 <sup>4</sup>	0.4	1.6	6.3	>6.3	>6.3
FA12	2x10 <sup>6</sup>	0.8	1.6	3.2	6.3	>6.3
Freezed	2x10 <sup>5</sup>	0.2	0.8	1.6	6.3	6.3
Culture	2x10 <sup>4</sup>	0.4	1.6	3.2	3.2	6.3
FA5L	3x10 <sup>7</sup>	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Fresh	3x10 <sup>6</sup>	1.6	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Culture	3x10 <sup>5</sup>	0.2	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
	3x10 <sup>4</sup>	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
FA5L	1x10 <sup>7</sup>	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Freezed	1x10 <sup>6</sup>	6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Culture	1x10 <sup>5</sup>	1.6	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
	1x10 <sup>4</sup>	6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
FA08	1x10 <sup>7</sup>	6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Fresh	1x10 <sup>6</sup>	1.6	6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Culture	1x10 <sup>5</sup>	6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
	1x10 <sup>4</sup>	1.6	6.3	>6.3	>6.3	>6.3
FA08	1x10 <sup>7</sup>	6.3	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Freezed	1x10 <sup>6</sup>	1.6	>6.3	>6.3	>6.3	>6.3
Culture	1x10 <sup>5</sup>	3.2	6.3	>6.3	>6.3	>6.3
	1x10 <sup>4</sup>	1.6	6.3	>6.3	>6.3	>6.3

Table 3(1) Influence of inoculum dose on MIC values of tylosin for *Mycoplasma hyosynoviae*

Strain	Dose of inoculum (CFU/ml)	Initial MIC	1 day after	2 days after	3 days after	4 days after
S16	3x10 <sup>7</sup>	0.1	0.2	0.2	0.4	0.4
Fresh	3x10 <sup>6</sup>	0.1	0.1	0.1	0.4	0.4
Culture	3x10 <sup>5</sup>	0.05	0.1	0.1	0.2	0.4
	3x10 <sup>4</sup>	0.1	0.1	0.1	0.2	0.8
S16	1x10 <sup>7</sup>	0.1	0.2	0.2	0.4	0.4
Freezed	1x10 <sup>6</sup>	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
Culture	1x10 <sup>5</sup>	0.05	0.1	0.1	0.2	0.2
FA06	1x10 <sup>7</sup>	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4
Fresh	1x10 <sup>6</sup>	0.05	0.1	0.1	0.2	0.2
Culture	1x10 <sup>5</sup>	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
FA06	1x10 <sup>7</sup>	0.1	0.1	0.1	0.4	0.8
Freezed	1x10 <sup>6</sup>	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
Culture	1x10 <sup>5</sup>	0.05	0.1	0.2	0.2	0.2
FA07	3x10 <sup>6</sup>	1.6	1.6	1.6	1.6	3.2
Fresh	3x10 <sup>5</sup>	0.8	1.6	3.2	3.2	6.3
Culture	3x10 <sup>4</sup>	0.8	1.6	3.2	6.3	6.3
	3x10 <sup>3</sup>	0.4	1.6	1.6	3.2	3.2
FA07	3x10 <sup>5</sup>	0.8	1.6	1.6	3.2	3.2
Freezed	3x10 <sup>4</sup>	1.6	1.6	1.6	1.6	3.2
Culture	3x10 <sup>3</sup>	0.4	0.8	1.6	3.2	3.2
FA09	4x10 <sup>7</sup>	0.2	0.2	0.4	1.6	3.2
Fresh	4x10 <sup>6</sup>	0.1	0.2	0.4	1.6	3.2
Culture	4x10 <sup>5</sup>	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
	4x10 <sup>4</sup>	0.1	0.1	0.2	0.2	0.4
FA09	3x10 <sup>7</sup>	0.2	0.2	0.4	1.6	3.2
Freezed	3x10 <sup>6</sup>	0.1	0.2	0.2	0.4	1.6
Culture	3x10 <sup>5</sup>	0.05	0.1	0.2	0.2	0.8
	3x10 <sup>4</sup>	0.1	0.2	0.2	0.2	0.8

中、このような集落が出現したのは3 2例あり、そのうち 小集落少数集落を非阻止とみなした方がプロス法におけるMICとより一致する場合が2 3例であり、阻止とみなした方がより一致する場合が7例であった。残りの2例は、矮小集落および少数集落の出現が2希釈以上におよび、いずれに解釈してもプロス法とそれぞれ1希釈宛高低にずれる場合であった。

**DMSO添加凍結保存菌液使用の可否:** *M. hyopneumoniae* は、10継代以内の新鮮分離株10株を用いてタイロシンにつき、また *M. hyosynoviae* は、基準株と10継代以内の新鮮分離株7株を用いてタイロシンおよびオキシテトラサイクリンにつき、新鮮培養菌液と、DMSOを添加して-70℃に10~15週間保存した菌

液とのMIC値を比較した。表2, 3, 5に示したように、いずれの菌種においても両者に有意の差異は見出し得なかった。

**Initial MICおよびFinal MICの判定時間について:** 先ず *M. hyosynoviae* とオキシテトラサイクリンについてみると(表2), 時間の経過とともにMIC値は上昇し、Initial MICの判定から4日後には全株8倍以上の上昇を示した。タイロシンにおいても同様の傾向を示したが、その上昇は大部分の株において4倍以内であった。また4日目以降では、阻止濃度の範囲内に1~2個所発育の認められるような場合が散見された。

*M. hyopneumoniae* においては、時間の経過によるMIC値の上昇は、*M. hyosynoviae* 程

Table 3(2) Influence of inoculum dose on MIC values of tylosin for Mycoplasma hyosynoviae

Strain	Dose of inoculum (CFU/ml)	Initial MIC	1 day after	2 days after	3 days after	4 days after
FA10	5x10 <sup>6</sup>	1.6	3.2	3.2	6.3	>6.3
	Fresh 5x10 <sup>5</sup>	1.6	3.2	3.2	3.2	>6.3
	Culture 5x10 <sup>4</sup>	0.4	1.6	1.6	3.2	3.2
	5x10 <sup>3</sup>	0.8	1.6	3.2	>6.3	>6.3
FA10	4x10 <sup>6</sup>	0.8	1.6	3.2	6.3	>6.3
	Freezed 4x10 <sup>5</sup>	0.4	1.6	1.6	3.2	6.3
	Culture 4x10 <sup>4</sup>	0.8	1.6	1.6	3.2	6.3
	4x10 <sup>3</sup>	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3
FA12	2x10 <sup>7</sup>	0.05	0.1	0.1	0.1	0.2
	Fresh 2x10 <sup>6</sup>	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1
	Culture 2x10 <sup>5</sup>	0.05	0.05	0.1	0.2	0.2
	2x10 <sup>4</sup>	0.025	0.05	0.05	0.1	0.2
FA12	2x10 <sup>6</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
	Freezed 2x10 <sup>5</sup>	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
	Culture 2x10 <sup>4</sup>	0.05	0.1	0.1	0.2	0.2
FASL	3x10 <sup>7</sup>	1.6	3.2	3.2	3.2	6.3
	Fresh 3x10 <sup>6</sup>	0.4	1.6	1.6	3.2	3.2
	Culture 3x10 <sup>5</sup>	0.8	1.6	1.6	3.2	3.2
	3x10 <sup>4</sup>	0.8	1.6	1.6	3.2	3.2
FASL	1x10 <sup>7</sup>	1.6	3.2	3.2	3.2	6.3
	Freezed 1x10 <sup>6</sup>	1.6	3.2	3.2	6.3	6.3
	Culture 1x10 <sup>5</sup>	0.8	1.6	3.2	3.2	3.2
	1x10 <sup>4</sup>	1.6	3.2	3.2	6.3	6.3
FA08	1x10 <sup>7</sup>	3.2	3.2	3.2	3.2	6.3
	Fresh 1x10 <sup>6</sup>	1.6	3.2	6.3	6.3	>6.3
	Culture 1x10 <sup>5</sup>	3.2	6.3	6.3	>6.3	>6.3
	1x10 <sup>4</sup>	1.6	6.3	6.3	>6.3	>6.3
FA08	1x10 <sup>7</sup>	3.2	3.2	3.2	6.3	6.3
	Fresh 1x10 <sup>6</sup>	1.6	3.2	6.3	6.3	>6.3
	Culture 1x10 <sup>5</sup>	3.2	6.3	6.3	>6.3	>6.3
	1x10 <sup>4</sup>	1.6	3.2	6.3	6.3	>6.3

Table 5. Comparison of initial MIC values of tylosin between fresh culture and freezed culture of Mycoplasma hyopneumoniae

Strain	Dose of inoculum (CCU/ml)	Fresh culture	Freezed culture
Y01	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.04	0.04
Y02	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.04	0.04
Y04	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.08	0.08
Y05	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.04	0.02
Y07	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.08	0.16
Y08	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.04	0.02
Y09	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.04	0.02
Y10	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.04	0.04
Y11	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.08	0.08
Y12	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.08	0.08

顕著ではなく、オキシテトラサイクリンの場合 initial MIC の判定から 4 日後においても 2 ~ 4 倍であり、タイロシンでは大部分の株において 2 倍に留まっていた (表 6)。

Table 4. Influence of inoculum dose on MIC values for Mycoplasma hyopneumoniae

Drug	Strain	Dose of inoculum (CCU/ml)	Initial MIC	1 day after	2 days after	3 days after
OTC <sup>a)</sup>	204/47	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	1.25	1.25	1.25	1.25
	Fresh	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	ND <sup>c)</sup>	ND	ND	ND
	Culture	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	0.63	1.25	1.25	1.25
		10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	ND	ND	ND	ND
TS <sup>b)</sup>	204/47	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.63	0.63	1.25	1.25
	Freezed	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	0.63	0.63	1.25	1.25
	Culture	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	1.25	1.25	1.25	1.25
		10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	0.63	0.63	1.25	1.25
TS <sup>b)</sup>	204/47	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	0.08	0.08	0.08	0.08
	Freezed	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	0.04	0.04	0.04	0.04
	Culture	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	0.04	0.04	0.04	0.04
		10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	0.04	0.04	0.04	0.04

Remarks. a) Oxytetracycline b) Tylosin c) Not done

Table 6. Increase of MIC values for Mycoplasma hyopneumoniae

Drug	Strain	Initial MIC (CCU/ml)	1 day after	2 days after	3 days after	4 days after
OTC <sup>a)</sup>	J	0.63	0.63	1.25	1.25	1.25
	201/49	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
	204/49	0.63	0.63	1.25	1.25	1.25
	215/24	0.08	0.16	0.16	0.32	0.32
	14/5/23	0.16	0.16	0.16	0.16	0.32
	16s/23	2.5	2.5	5.0	5.0	5.0
	16L/23	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0
	20L/23	0.32	0.63	0.63	1.25	1.25
	Y06/08	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5
	Y13/13	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Y14/16	0.63	1.25	1.25	1.25	1.25	
TS <sup>b)</sup>	J	0.08	0.08	0.08	0.16	0.16
	201/49	0.08	0.08	0.08	0.08	0.16
	204/49	0.04	0.04	0.08	0.08	0.08
	215/24	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
	16s/23	0.02	0.04	0.08	0.08	0.08
	16L/23	0.04	0.08	0.08	0.08	0.16
	20L/23	0.08	0.08	0.16	0.16	0.16
	Y06/08	0.04	0.04	0.04	0.04	0.08
	Y13/13	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
	Y14/16	0.08	0.08	0.08	0.16	0.16

Remarks. a) Oxytetracycline b) Tylosin

## 考 察

豚由来のMに関しては、栄研C培地は使用できず、*M. hyopneumoniae*ではBHL-Brothをまた*M. hyosynoviae*ではmA-Brothあるいはm-Agarを用いるべきであった。

接種菌量によるMICの変動は、Initial MICでみると2～8倍の差が認められたが、接種菌量が増加するにつれてMIC値が高くなるといった傾向は示さず、またInitial MIC判定の翌日ではその差は2倍以内であることから、この変動は判定時間のずれに起因するものと考えられた。従って供試した $10^4$ から $10^7$ の範囲では、両菌種とも、MIC値は接種菌量によって影響されないものと考えられた。しかしながら、*M. hyopneumoniae*の新鮮分離株の中には、 $10^5$  CCU/ml以下の接種菌量では、菌液対照のpHの低下が十分ではなく、判定に困難を来す場合があった。また時間の経過によるMICの変動をみると、*M. hyosynoviae*の中には、タイロシンに対し、 $10^6$ 以上の接種菌量ではInitial MICの判定後3～4日後にInitial MICの8～32倍に達するにもかかわらず、 $10^5$ 以下の接種菌量では2～4倍に留まっていた株(FAO9)が存在した。このことは、Final MICをみる意義が、被検菌の試験薬剤に対する耐性獲得の度合をみることにあるとするならば、接種菌量は $10^6$ 以上を使用すべきであることを示唆している。以上のようなことから接種菌量は、 $10^6 \sim 10^7$  CFU or CCU/mlを用いるのが最も妥当と考えられた。

寒天希釈法における少数集落および矮小集落は、非阻止とみなした方がプロス法の値とよりよく一致した。

DMSOを添加して $-70^\circ\text{C}$ に10～15週間保存した菌液を用いて測定したMIC値は、新鮮培養菌を用いた場合と有意の差は見出し得ず、MICの測定に供試可能と考えられた。

Initial MICおよびFinal MICに関しては、*M. hyopneumoniae*の場合は、両者に著しい差は認められなかったが、*M. hyosynoviae*では菌株および薬剤によっては、時間の経過とともにMIC値は大幅に上昇した。また本菌の場合、Initial MICの判定から4日目以降では阻止濃度の範囲内に1～2個所発育の認められる場合が散見されはじめるので、Final MICは、Initial MICの判定から3日以内とすべきであった。

アルギニン分解性のMである*M. hyosynoviae*のMIC測定に際し、ブドウ糖分解性のMと特に異なる点は見出し得なかったが、接種菌液はアルギニンを含まない培地で培養することが望ましかった。何となればアルギニンを含んだ培地で培養した菌液の $10^{-1}$ 希釈を用いると、菌数が $10^6 \sim 10^7$  CFU/mlであってもMIC値は著しく高くなること、およびアルギニンを含んだ培地では、最高菌量に達してから急速に死滅するため、高濃度の菌液が得にくい等の理由からであった。