

動物由来の細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (動物用抗菌剤研究会標準法)

被検菌株の抗菌剤 (抗生物質, 合成抗菌剤) 感受性測定には, 日本化学療法学会標準法 (1981) に準拠し, 次の寒天平板希釈法を用いる。

(1) 感受性測定用培地

ミュラーヒントン培地を基礎培地とした半合成培地を使用する。いずれの会社の製品でもよいが, 製造会社名を明記すること。

(2) 薬剤の濃度段階

各平板培地 1 ml あたりに含まれる薬剤の最終濃度は下記のとおり 100 μg より 0.025 μg に至る 2 倍希釈系列とする。

100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$

なお, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度を使用する場合は, 200, 400, 800, 1,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。ただし, ペンジルペニシリン (PCG) の濃度については unit/ml を用いる。対照として薬剤を含まない平板を作る。

(3) 増菌用培地

下記のいずれでもよいが, 使用する感受性測定用寒天培地と同一の会社の製品を使用することが望ましい。なお製造会社名は明記すること。

- ① Mueller-Hinton broth (Difco)
- ② 感受性測定用ピジョン (栄研, ニッスイ)

(4) 接種用菌液

一般的には使用直前に増菌用培地に 37°C, 18~20 時間培養したものを滅菌生理食塩液又は増菌用培地で菌数が 10⁶CFU/ml になるように調整^{*)}し, 接種菌液とする。

(5) 菌の接種法

ニクロム線ループ (なるべく内径 1 mm 前後の

もの) もしくは市販ディスポーザブルループ (0.001 ml) を用いて平板培地上に 2 cm 程度画線塗抹または 1 スポット を接種する。または特殊の接種装置を用いて多数の検体 (菌株) を同時に接種してもよい。

(6) 培養時間・温度

35~37°C, 18~20 時間。

(7) 判定

菌の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 (MIC) とする^{*)}。

<注>

本法は一般細菌, 主としてブドウ球菌, 大腸菌及びサルモネラなどに対する薬剤の MIC 測定を目的とするものである。

注 1) 接種菌液の調整法

上記増菌培地では, 37°C, 18~20 時間培養で, ブドウ球菌, 大腸菌及びサルモネラなどでは 10⁸~10⁹CFU/ml に達するので, 上記 (5) と同様のループを用いて, その 1 ループ量を 1 ml の滅菌生理食塩液で混釈すると, ほぼ 10⁶CFU/ml となる。

それ以外の菌種の場合には, 上記増菌培地における 37°C, 18~20 時間培養による菌数が異なることがあるので, 被検菌種について予め菌数を確認しておくこと。

なお, いずれの場合でも, 増菌培養した菌は, 平等な菌液を作るため, プレンドーなどでよく振盪してから, 混釈に用いる。

注 2) 判定法

判定は対照平板培地 (薬剤非含有) 上における被検菌株の発育度と対比して行う。

なお, 薬剤加培地において, 数個 (5 個以内) の集落が認められたときは, 突然変異菌であるか

ら、発育阻止とみなしてよい。ただし小さな集落が多数見られるときは、その菌は当該薬剤によって耐性が誘導されたもので、発育と認める。

判定に困難が生じたときは、他種混在菌の有無などを詳細に記録すると同時に、常にこれと並行して実施した対照菌株（後述）の感受性を参考にし、総合的に判定を行う。

注3) 感受性測定用平板の作製法

培地を沸騰水中で加温溶解し、その温度が60～55℃になったところで、薬剤溶液の1容に対して培地を9容の割に加え、よく混ぜ合わせてからシャーレに流して平板とする。寒天が固化した後、寒天面の凝固水を取り除くため、平板をふらん器に納め、裏返しにしてシャーレの蓋を少し開き、0.5～1時間乾燥させる。作製した平板は作製当日中に使用すること。

なお、培地の秤量・調製にあたっては、後に薬剤溶液を加えたときの培地成分が、所定の濃度となるよう、予め考慮しておくこと。

注4) 被検菌株と対照菌株

被検菌株はなるべく分離後、継代2・3代以内のものを使用する。なお、培養後長期保存(−20℃以下の凍結保存が望ましい)してある菌株を使用する場合は、使用前に少なくとも1回以上継代し、培養直後の菌を使用する。

測定に関しては常に対照菌株を使用すること。なお、対照菌株としては日本化学療法学会の指定する下記の菌株を用いる。

Staphylococcus aureus 209 P 株

Escherichia coli NIHJ 株

注5) 供試薬剤の種類、薬剤標準原液の作製、希釈法

イ. 被検菌の全般的な薬剤感受性測定に用いる薬剤は、各系統の代表的薬剤を網羅するように選

択する。いずれも常用標準品又はこれに準ずるものを用いること。なお、薬剤の略号は動物用抗菌剤研究会報の巻末にある「動物用抗菌剤・合成抗菌剤略語表」(毎年追加改訂)を参照する。

ロ. 感受性測定平板作製の各薬剤はそれぞれの力価に応じて換算の上、化学天秤で0.1 mgの単位まで正確に秤量し、滅菌精製水を適量加えて溶解し、1,000 µg/mlの原液とする。

ただし、薬剤によっては水に溶解しないものがあるので、その場合には適当な溶媒(たとえばメタノール、エタノール、DMSOなど、キノロン系薬剤の大部分では0.1 N NaOH液)を少量用いて溶解後、水で希釈する。その際には、供試薬剤を加えない溶媒加培地を作製し、溶媒が当該濃度において被検菌の発育に影響がないことを確認する。

ハ. 1,000 µg/mlの各種薬剤原液ができたならば、滅菌メスピペットを用いて滅菌精製水で2倍希釈法により500～0.25 µg/mlの溶液を作り、これを上記3)の感受性測定用平板培地の作製に用いる。

また、高濃度薬剤加平板作製のための希釈は別に高濃度薬剤原液(8,000～16,000 µg/ml)を作製しておき、同様に行う。

いずれの場合においても、希釈に用いるメスピペットは必ず希釈のたびに置き替えること。
ニ. 各薬剤原液は原則として測定のためごとに調製し、作製当日中に使い切るように配慮すること。

(1997年3月改訂)

(動物用抗菌剤研究会, MIC測定法改訂委員名: 高橋 勇, 内田幸治, 吉村治郎, 高橋敏雄, 沢田拓士)

動物用抗菌剤の臨床試験実施基準（試案）

動物用抗菌剤研究会臨床評価検討委員会

まえがき

この基準（試案）が設定されるに至った経緯は次の通りである。

当研究会では、設立以来、会則に謳われている各種の事業を実施してきたが、その中で主なものの一つに挙げられるのは、動物の主要な病原菌に関する薬剤感受性試験の実施基準の作成であり、これらについては既刊の会報に逐次掲載し、会員の参考に供してきた。一方、動物の主要な細菌感染症に対する臨床試験の実施基準に関しては、以前から懸案となっていたが、対象疾病の幅が広く、作業にはかなりの時間、労力、予算を要するため、手付かずのままとなっていた。しかし、事の重要性に鑑み、平成6年に至り、本会ではこの懸案を実施に移す方針を固め、理事会の議を経て、総会に提案して了承を得た。

そこで本会では、理事であり、かつ臨床の専門家である松浦健二麻布大学教授と協議の上で、この問題に関する委員会を設置することとした。委員には臨床、基礎、製薬の各分野からそれぞれ数名ずつの専門家をお願いし、本会側からは理事長と事務局が加わることとした（委員名は後記）。また、会の名称は「動物用抗菌剤臨床評価検討委員会」とした。

この委員会は、平成6年8月に第1回が開催され、松浦健二教授を委員長に選出し、その後の作業方針について活発な論議が行われた。その結果、当面の対象動物は牛と豚に限定し、対象疾病には、これらの動物について細菌性呼吸器病（豚の萎縮性鼻炎は除く）と細菌性下痢症を取り上げることとなった。なお、作業を遂行する上の参考資料として、すでに承認を受けているこれら感染症を対

象とした治療薬について実施された臨床試験の方法、効果判定法などを把握した上で、本会としての衆知を結集して、実情に即し、しかも理想的な基準を作ることを基本方針とした。このため、これらの製剤の承認を受けている製薬会社に資料の提供を依頼することになった。

以後、現在（平成9年1月末）に至る約2年半の間に18回に亘る委員会が開かれ、その間、必要に応じて臨時委員を助言者をお願いする場合もあり、作業は精力的かつ慎重に進められた。平成8年春に至り、上記の設定目標について一応の素案が纏まったので、本会理事会及び総会にも概要を報告し、さらに、資料提供をお願いした各製薬会社にもこの案を送付して意見を求めた。その上で委員会では素案について再度の検討を重ねた上で成案を得たので、これを以下に示す通り会員にお知らせすることとした。

なお、以上の経過中に平成8年秋に至って、日本動物薬事協会への事務委託事業に関して農林水産省からの要望があり、本会を中心に動物用抗菌剤の臨床試験実施の指針を国際基準作成のための資料として検討して頂きたい旨の申出があった。その際、乳房炎の治療薬についても指針作成の要望があったので、この点も目下当委員会で検討中である。

最後に今回の基準作成に当たり、ご多忙中にもかかわらず長期間に亘って積極的なご協力を頂いた松浦教授はじめ、委員の方々に深く感謝します。また、資料の提供を頂いた各製薬会社に厚く御礼申し上げます。

（検討委員名）松浦健二（麻布大）、星 欽彌（千葉共済）、金子一幸（麻布大）、小久江栄一（農工大）、吉村治郎（動薬検）、高橋敏雄（動薬検）、内田幸治（ファイザー製薬）、桑野 昭（第一製薬）、

高橋 勇（動物用抗菌剤研究会）、沢田拓士（日獣大、本会事務局）、大島 慧（日本動薬協）、中村政幸（現北里大、平成7年9月まで）。

（臨時委員として助言を頂いた方々）山本輝次（千葉共済）、八木澤守正（抗生物質学術協議会）、畦地速見（日本動薬協）（敬称略、順不同）。

平成9年1月28日
動物用抗菌剤研究会理事長
高橋 勇

動物用抗菌剤の臨床試験実施基準

この基準は、動物用抗菌剤の製造（輸入）承認申請に必要な臨床試験を実施する際のガイドラインとして設定した。

供試する抗菌剤は、基礎的な試験により有効菌種及び動物に対する催奇形性、発癌性を含めた安全性が確認され、畜産物に対する安全性が明らかにされた薬剤で、すでにこれらに基づいて用法、用量、休薬期間が設定された薬剤を想定して作成した。

臨床試験の実施基準は、このような抗菌剤を用いて実際の飼育環境において治験を実施し、対象疾病に対する供試薬剤の有効性を検討するものとした。

なお、動物用抗菌剤としての有効性を評価するための十分な試験成績が得られるならば、この基準以外の方法によることもできる。その場合は十分な科学的根拠をもって、その試験の妥当性を主張することが必要と思われる。

豚の細菌性肺炎に対する抗菌剤 の臨床試験実施基準

1. 診断基準

試験開始前に肺炎症状を呈した複数の罹患動物の死亡例又は鑑定殺例の肺病変部を培養し、肺炎起因菌の分離・同定及び薬剤感受性試験を行う。その結果、主としてアクチノバシラス・プルロニューモニエ、パスツレラ・ムルトシダが分離された群を細菌性肺炎と診断する。これらの検査法は

別に定める。

2. 臨床症状の評価法

呼吸状態、発咳、活力、食欲、体温について表1に従ってスコア化し、それらを合計する。

表1 臨床症状の配点表

項目	スコア			
	0	1	2	3
呼吸状態	正常	やや速迫	速迫	困難
発咳	なし	散発	頻発	・
活力	正常	減退	消失	・
食欲	正常	やや不振	不振	廃絶
体温(°C)	38.0～ 39.5未満	39.5～ 40.5未満	37.0～ 38.0未満 又は40.5～ 41.5未満	37.0未満 又は 41.5以上

ただし、対象疾病による死亡例は各項目の最高スコアの合計（13点）とする。

3. 肺病変の評価法

罹患動物の死亡例又は鑑定殺例を検査し、表2に従ってスコア化し、それらを合計する。

表2 肺病変の配点表

項目	スコア		
	0	1	2
肺の充出血	なし	軽度	重度
結節形成	なし	軽度	重度
胸膜癒着	なし	軽度	重度
胸水貯溜	なし	軽度	重度

ただし、軽度とは充出血が肺表面積の1/6以下、小結節が少数、癒着が部分的、胸水貯溜量が10 ml 以下の場合をいう。

4. 群の設定法

体温が39.5°C以上であり、かつ臨床症状のスコアの合計が5以上である個体を用い、試験群と対照群との間に臨床症状のスコア及び品種、年齢、性別、体重、栄養状態、飼育形態等片寄りのないように群の設定を行う。

1) 試験群

2 施設以上を設定し、原則として合計60頭以上を用いる。

2) 対照群

各施設毎に薬剤無投与、偽薬剤投与又は対照薬剤を投与する群を対照群とし、統計学的処理の可能な頭数を用いる。ただし、対照薬剤は、対象疾病に対する効能を有し、かつ使用頻度の高い薬剤、又は試験薬剤と同系統の抗菌剤を用いる。

5. 併用薬剤の使用制限

併用薬剤については、当該医薬品の効果判定に影響を及ぼす医薬品を併用してはならない。

6. 効果判定法

1) 判定時期

薬剤投与終了後、1～2日目とする。

2) 臨床症状による判定

試験群、対照群の判定可能な症例を表1のスコアによる下記の改善率により、著効(85～100)、有効(70～85未満)、やや有効(50～70未満)、無効(50未満)に分類し、集計した後下記の有効率を求める。次いで、試験群、対照群間の有効率の差を統計学的手法を用いて検定し、有効性を判定する。

$$\text{改善率} = \frac{\left(\frac{\text{投薬前のスコア} - \text{投薬終了後} \\ \text{1～2日目のスコア}}{\text{投薬前のスコア}} \right) \times 100}{}$$

$$\text{有効率} = \frac{\text{著効例数} + \text{有効例数}}{\text{判定可能な症例数}} \times 100$$

7. 副作用の観察

試験期間中は、副作用の有無、その種類及び程度を観察し、記録する。

8. 参考となる検討事項

1) 剖検所見及び菌検索

効果判定の後に、若干の個体を用いて肺病変及び起因菌の消長を確認する。

2) 薬剤感受性試験

分離株について、他の抗菌剤との比較を行う。

3) 転帰の確認

判定後7日目の状態により、再発の有無及び副作用を確認する。

4) 経済効果等の検討を行う。

9. 治験実施計画書の作成

臨床試験の実施に当たっては、動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準(GCP)に準拠し、治験実施施設毎の診断基準・効果判定法・副作用の観察などの統一性を考慮して治験実施計画書を作成する。なお、治験実施計画書には、除外・脱落例の取扱い及び他の病原体の関与する症例の取扱いについて規定されることが望ましい。

付記

1. 起因菌の分離・同定法 (p. 49-50)
2. 薬剤感受性試験法 (p. 51-52)
3. 統計学的検定法 (p. 54-55)

豚マイコプラズマ肺炎に対する 抗菌剤の臨床試験実施基準

I. 予備試験

マイコプラズマ感染症は、臨床症状からは他の呼吸器疾患との鑑別が不可能である。そこで、供試農場がマイコプラズマで汚染されているか否かを確認してから本試験を実施する。

1. 供試農場の選定法

出荷豚約30頭のと畜場における剖検所見(下記)から供試農場を選定する。

2. 肺の肉眼的病変の判定基準(と畜場所見)

(図1参照)

(-) : 肺のいずれの部位にもまったく肝変化が認められない。

(+) : 肺の前葉の背面又は腹面の左右か一方に肝変化が認められる。

(++) : 肺の前葉と中葉の背面及び腹面の左右か一方に肝変化が認められる。

(+++): 肺の前葉と中葉及び後葉の背面及び腹面の左右か一方に肝変化が認められる。

(++++): 肺の前葉と中葉及び後葉の背面や腹面の大部分に亘り肝変化が認められる。

肺の肉眼的病変で、++以上の所見が供試豚の40%以上に認められた農場をマイコプラズマ汚染農場とする。

II. 本試験

1. 群の設定法

離乳後の子豚を用いて試験群と対照群との間に品種、年齢、性別、体重、栄養状態、飼育形態等片寄りのないよう群の設定を行う。

1) 試験群

2施設以上を設定し、原則として合計60頭以上を用いる。

2) 対照群

各施設毎に薬剤無投与、偽薬剤投与又は対照薬剤を投与する群を対照群とし、統計学的処理の可能な頭数を用いる。ただし、対照薬剤は、対象疾病に対する効能を有し、かつ使用頻度の高い薬剤、又は試験薬剤と同系統の抗菌剤を用いる。

2. 薬剤投与方法

原則として、7日間投薬・7日間休薬・7日間投薬の2クール方式で行う。(ただし、注射剤の場合は3~5日間投与1クール方式で行う。)

3. 検査項目

1) 体重測定

投薬前と投薬終了後30日目及び80日目の3回体重測定を行う。

2) 飼料要求率

試験開始後、一定期間内の総増体量と総飼料摂取量を求めて、総飼料摂取量を総増体量で除して求める。

3) 肺の肉眼的病理検査

出荷豚の肺病変を図1に従って検査する。

4) 抗体検査

検査を行う場合は、投薬前と投薬終了後80日目に行う。

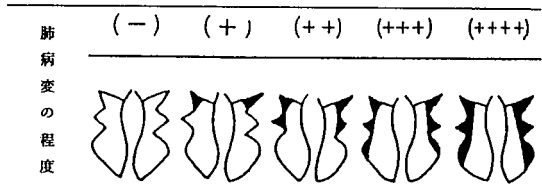
5) 細菌の分離・同定 (n=5以上)

出荷豚5頭以上の肺病変部(肺に病変がない場合は前葉)からマイコプラズマの分離・同定を行う。なお、類症鑑別のため、他の細菌につ

いても分離・同定を行う。

4. 効果判定法

増体重の変化および肺病変の成績について統計学的手法を用いて検定し、有効性を判定する。さらに、飼料要求率、抗体検査成績、マイコプラズマおよび他の細菌分離成績については参考に供する。



なお、類症鑑別のため、肺充出血、胸膜の癒着、結節形成および出血性硬結の有無を記録する。

図1 肺の肉眼的病変の程度

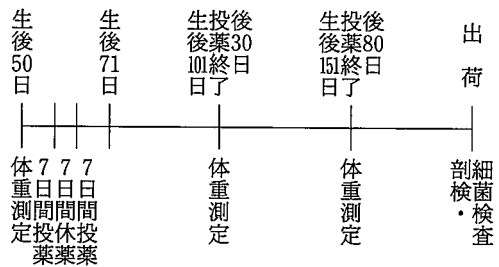


図2 薬剤投与及び検査プログラムの一例(参考)

5. 副作用の観察

試験期間中は、副作用の有無、その種類及び程度を観察し、記録する。

6. 治験実施計画書の作成

臨床試験の実施に当たっては、動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準(GCP)に準拠し、治験実施施設毎の診断基準・効果判定法・副作用の観察などの統一性を考慮して、治験実施計画書を作成する。なお、治験実施計画書には、除外・脱落例の取扱い及び他の病原体の関与する症例の取扱いについて規定されることが望ましい。

付記

1. 起因菌の分離・同定法 (p. 50)
2. 薬剤感受性試験法 (p. 52-53)
3. 統計学的検定法 (p. 54-55)

牛の細菌性肺炎に対する抗菌剤 の臨床試験実施基準

1. 診断基準

試験開始前に肺炎症状を呈した複数の罹患動物の鼻汁又は死亡例の肺病変部を培養し、肺炎起因菌の分離・同定及び薬剤感受性試験を行う。その結果、主としてパストレラ・ムルトシダ、パストレラ・ヘモリチカが分離された群を細菌性肺炎と診断する。なお、マイコプラズマ、ウレアプラズマが分離された群もこれに準ずる。これらの検査法は別に定める。

2. 臨床症状の評価法

呼吸状態、呼吸音、鼻汁、発咳、活力、食欲、体温について表1に従ってスコア化し、それらを合計する。

表1 臨床症状の配点表

項目	スコア			
	0	1	2	3
呼吸状態	正常	やや速迫	速迫	困難
呼吸音	正常	弱 ^{a)}	中 ^{b)}	強 ^{c)}
鼻汁	なし	水様	膿性	・
発咳	なし	散発	頻発	・
活力	正常	減退	消失	・
食欲	正常	やや不振	不振	廃絶
体温 (°C)	1歳	38.0~	39.5~	40.5~
	以上	39.5未満	40.5未満	41.5未満
	1歳	38.5~	40.0~	40.5~
	未満	40.0未満	40.5未満	41.5未満

^{a)} 異常な呼吸音が肺の一部で聞かれる。

^{b)} 強度の気管支呼吸音、肺胞音が聞かれる。

^{c)} 強度のラッセル音が聞かれる。

ただし、対象疾病による死亡例は各項目の最高スコアの合計(18点)とする。

3. 死亡例の取扱い

罹患動物の死亡例があった場合は、細菌学的、病理学的検査を実施し、死因を究明することが望ましい。

4. 群の設定法

体温が1歳未満では40.0°C以上、1歳以上では39.5°C以上であり、かつ臨床症状のスコアの合計が7以上である個体を用い、試験群と対照群との間に臨床症状のスコア及び品種、年齢、性別、体重、栄養状態、飼育形態等片寄りのないよう群の設定を行う。

1) 試験群

2 施設以上を設定し、原則として合計60頭以上を用いる。

2) 対照群

各施設毎に薬剤無投与、偽薬剤投与又は対照薬剤を投与する群を対照群とし、統計学的処理の可能な頭数を用いる。ただし、対照薬剤は、対象疾病に対する効能を有し、かつ使用頻度の高い薬剤、又は試験薬剤と同系統の抗菌剤を用いる。

5. 併用薬剤の使用制限

併用薬剤については、当該医薬品の効果判定に影響を及ぼす医薬品を併用してはならない。

6. 効果判定法

1) 判定時期

薬剤投与終了後、1~2日目とする。

2) 臨床症状による判定

試験群、対照群の判定可能な症例を表1のスコアによる下記の改善率により、著効(85~100)、有効(70~85未満)、やや有効(50~70未満)、無効(50未満)に分類し、集計した後、下記の有効率を求める。試験群、対照群間の有効率の差を統計学的手法を用いて検定し、有効性を判定する。

$$\text{改善率} = \frac{\text{投薬前のスコア} - \text{投薬終了後} \text{のスコア}}{\text{投薬前のスコア}} \times 100$$

$$\text{有効率} = \frac{\text{著効例数} + \text{有効例数}}{\text{判定可能な症例数}} \times 100$$

7. 副作用の観察

試験期間中は、副作用の有無、その種類及び程度を観察し、記録する。

8. 参考となる検討事項

1) 薬剤感受性試験

分離株について、他の抗菌剤との比較を行う。

2) 転帰の確認

判定後7日目の状態により再発の有無及び副作用を確認する。

3) 経済効果等の検討を行う。

9. 治験実施計画書の作成

臨床試験の実施に当たっては、動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準（GCP）に準拠し、治験実施施設毎の診断基準・効果判定法・副作用の観察などの統一性を考慮して、治験実施計画書を作成する。なお、治験実施計画書には、除外・脱落例の取扱い及び他の病原体の関与する症例の取扱いについて規定されることが望ましい。

付 記

1. 起因菌の分離・同定法（p. 50）
2. 薬剤感受性試験法（p. 53）
3. 統計学的検定法（p. 54-55）

豚の大腸菌性下痢に対する抗菌剤 の臨床試験実施基準

1. 診断基準

試験開始前に下痢の症状を呈した複数の罹患動物の直腸便、直腸スワブ、新鮮な排泄便又は死亡例の腸粘膜の搔爬片を培養し、起因菌の分離・同定及び薬剤感受性試験を行う。その結果、主として毒素原性大腸菌などの病原性が推定される大腸菌が分離された群、又は、直腸便で 10^8 個/g以上の大腸菌が検出された場合を大腸菌性下痢と診断する。これらの検査法は別に定める。

2. 臨床症状の評価法

表1に従って、臨床症状をスコア化し、それらを合計する。

3. 死亡例の取扱い

罹患動物の死亡例があった場合は、細菌学的、病理学的検査を実施し、死因を究明することが望

ましい。

表1 臨床症状の配点表

項目	スコア			
	0	1	2	3
糞便の状態	正常	軟便	泥状便	水様便 ^{a)}
糞便の色調	正常	灰白色	乳白色 ^{b)}	・
活力	正常	減退	消失	・
食欲	正常	やや不振	不振	廃絶
被毛	正常	失沢	粗剛 ^{c)}	・
衰弱	なし	軽度	中等度～重度	・

^{a)} 粘血便を含む。

^{b)} 黄白色を含む。

^{c)} 立毛を含む。

ただし、対象疾病による死亡例は各項目の最高スコアの合計（14点）とする。

4. 群の設定法

糞便の状態のスコアが2以上であり、かつ臨床症状のスコアの合計が7以上である個体を用い、試験群と対照群との間に臨床症状のスコア、及び品種、年齢、性別、体重、栄養状態、飼育形態等片寄りのないよう群の設定を行う。

1) 試験群

2施設以上を設定し、原則として合計60頭以上を用いる。

2) 対照群

各施設毎に薬剤無投与、偽薬剤投与又は対照薬剤を投与する群を対照群とし、統計学的処理の可能な頭数を用いる。ただし、対照薬剤は、対象疾病に対する効能を有し、かつ使用頻度の高い薬剤、又は試験薬剤と同系統の抗菌剤を用いる。

5. 併用薬剤の使用制限

併用薬剤については、当該医薬品の効果判定に影響を及ぼす医薬品を併用してはならない。

6. 効果判定法

1) 判定時期

薬剤投与終了後、2～3日目とする。

2) 臨床症状による判定

試験群、対照群の判定可能な症例を表1のスコアによる下記の改善率により、著効（85～100）、有効（70～85未満）、やや有効

(50~70 未満), 無効 (50 未満) に分類し, 集計した後下記の有効率を求める。次いで, 試験群, 対照群間の有効率の差を統計学的手法を用いて検定し, 有効性を判定する。

$$\text{改善率} = \frac{\left(\frac{\text{投薬前のスコア} - \text{投薬終了後} \\ \text{2~3日目のスコア}}{\text{投薬前のスコア}} \right) \times 100}{\text{投薬前のスコア}}$$

$$\text{有効率} = \frac{\text{著効例数} + \text{有効例数}}{\text{判定可能な症例数}} \times 100$$

7. 副作用の観察

試験期間中は, 副作用の有無, その種類及び程度を観察し, 記録する。

8. 参考となる検討事項

1) 菌検索

効果判定の後に, 診断基準に示した検査材料を用いて起因菌の消長を確認する。

2) 薬剤感受性試験

分離株について, 他の抗菌剤との比較を行う。

3) 転帰の確認

判定後 5 日目の状態により再発の有無及び副作用を確認する。

4) 経済効果等の検討を行う。

9. 治験実施計画書の作成

臨床試験に実施に当たっては, 動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準 (GCP) に準拠し, 治験実施施設毎の診断基準・効果判定法・副作用の観察などの統一性を考慮して, 治験実施計画書を作成する。なお, 治験実施計画書には, 除外・脱落例の取扱い及び他の病原体の関与する症例の取扱いについて規定されることが望ましい。

付記

1. 起因菌の分離・同定法 (p. 51)
2. 薬剤感受性試験法 (p. 40-41; 54)
3. 統計学的検定法 (p. 54-55)

牛の大腸菌性下痢に対する抗菌剤 の臨床試験実施基準

1. 診断基準

試験開始前に下痢の症状を呈した複数の罹患動物の直腸便, 直腸スワブ, 新鮮な排泄便又は死亡例の腸粘膜の搔爬片を培養し, 起因菌の分離・同定及び薬剤感受性試験を行う。その結果, 主として毒素原性大腸菌などの病原性が推定される大腸菌が分離された群, 又は, 直腸便に 10^8 個/g 以上の大腸菌が検出された場合を大腸菌性下痢症とする。これらの検査法は別に定める。

2. 臨床症状の評価法

表 1 に従って, 臨床症状をスコア化し, それらを合計する。

表 1 臨床症状の配点表

項目	スコア			
	0	1	2	3
糞便の状態	正常	軟便	泥状便	水様便 ^{a)}
糞便の色調	正常	灰白色	乳白色	・
活力	正常	減退	消失	・
食欲	正常	やや不振	不振	廃絶
被毛	正常	失沢	立毛	・
脱水 ^{b)}	なし	軽度	中等度	重度

^{a)} 粘血便を含む。

^{b)} 脱水の状態は頸部皮膚のつまみテスト又は眼球陥没の程度で判定する。

ただし, 対象疾病による死亡例は各項目の最高スコアの合計 (15点) とする。

3. 死亡例の取扱い

罹患動物の死亡例があった場合は, 細菌学的, 病理学的検査を実施し, 死因を究明することが望ましい。

4. 群の設定法

糞便の状態のスコアが 2 以上であり, かつ臨床症状のスコアの合計が 7 以上である個体を用い, 試験群と対照群との間に臨床症状のスコア, 及び品種, 体重, 栄養状態, 飼育形態等片寄りのないように群の設定を行う。

1) 試験群

2 施設以上を設定し、原則として合計 60 頭以上を用いる。

2) 対照群

各施設毎に薬剤無投与、偽薬剤投与又は対照薬剤を投与する群を対照群とし、統計学的処理の可能な頭数を用いる。ただし、対照薬剤は、対象疾病に対する効能を有し、かつ使用頻度の高い薬剤、又は試験薬剤と同系統の抗菌剤を用いる。

5. 併用薬剤の使用制限

併用薬剤については、当該医薬品の効果判定に影響を及ぼす医薬品を併用してはならない。

6. 効果判定法

1) 判定時期

薬剤投与終了後、2～3 日目とする。

2) 臨床症状による判定

試験群、対照群の判定可能な症例を表 1 のスコアによる下記の改善率により、著効 (85～100)、有効 (70～85 未満)、やや有効 (50～70 未満)、無効 (50 未満) に分類し、集計した後下記の有効率を求める。次いで、試験群、対照群間の有効率の差を統計学的手法を用いて検定し、有効性を判定する。

$$\text{改善率} = \frac{\left(\frac{\text{投薬前のスコア} - \text{投薬終了後} \right)}{\text{2～3 日目のスコア}} \times 100}{\text{投薬前のスコア}}$$

$$\text{有効率} = \frac{\text{著効例数} + \text{有効例数}}{\text{判定可能な症例数}} \times 100$$

7. 副作用の観察

試験期間中は、副作用の有無、その種類及び程度を観察し、記録する。

8. 参考となる検討事項

1) 菌検索

効果判定の後に、診断基準に示した検査材料を用いて起因菌の消長を確認する。

2) 薬剤感受性試験

分離株について、他の抗菌剤との比較を行う。

3) 転帰の確認

判定後 5 日目の状態により再発の有無及び副作用を確認する。

4) 経済効果等の検討を行う。

9. 治験実施計画書の作成

臨床試験の実施に当たっては、動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準 (GCP) に準拠し、治験実施施設毎の診断基準・効果判定法・副作用の観察などの統一性を考慮して、治験実施計画書を作成する。なお、治験実施計画書は、除外・脱落例の取扱い及び他の病原体の関与する症例の取扱いについて規定されることが望ましい。

付記

1. 起因菌の分離・同定法 (p. 51)
2. 薬剤感受性試験法 (p. 40-41; 54)
3. 統計学的検定法 (p. 54-55)

付記 1. 起因菌の分離・同定法

豚呼吸器病病原菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) の分離・同定法

試験開始前に肺炎症状を呈した罹病動物の死亡又はと殺例の肺病変部を培養し、起因菌の分離同定を行う。遠隔地で分離を行う場合、臓器は病変部を境界部を含み大きく採材し、冷凍下 (-20°C) で輸送する。

培養は、材料を 5% 馬血液加寒天培地と、5% 馬血液加トリプトソイ・チョコレート寒天培地あるいは β -NADH 加 HP 基礎培地 (北研) に塗抹し、37°C で 24～48 時間、5～10% CO₂ 下で行う。

分離菌の同定は、集落性状及びグラム染色から菌形を確認した後、生物学的性状検査¹⁾を行う。菌の保存はミストディスク²⁾に、できるだけ多数懸濁させ、密栓後、-80°C で保存する。

参考文献

- 1) 全国家畜衛生職員会. 1985. 豚胸膜肺炎. 170-171, 病性鑑定マニュアル (農水省畜産局監修), 東京.
- 2) 農林水産技術会議事務局・農業環境技術研究所. 1977. (8) 海洋細菌, 98, 微生物の長期保存法 - 農林水産関連一, 東京.

豚呼吸器病病原菌 (*Pasteurella multocida*) の分離・同定法

試験開始前に肺炎症状を呈した罹病動物の死亡又はと殺例の病変部を培養し、起因菌の分離同定を行う。遠隔地で分離を行う場合、臓器は病変部を境界部を含み大きく採材し、冷凍下 (-20°C) で輸送する。

培養は、材料を5%馬血液加寒天培地、それにバンコマイシン (30 mg/l) を添加した培地 (材料が汚染している場合)、あるいは β -NADH 加 HP 基礎培地 (北研) に塗抹し、 37°C で 24~48 時間行う。

分離菌の同定は、集落性状及びグラム染色から菌形を確認した後、生物学的性状検査¹⁾を行う。菌の保存はトリプトソイブイオンに5%馬血清 (他の動物血清でもよい) を加えた培地に、できるだけ多数懸濁させ、密栓後、 -80°C で保存する。

参考文献

- 1) 全国家畜衛生職員会. 1985. 豚のパスツレラ症. 156-157, 病性鑑定マニュアル (農水省畜産局監修), 東京.

豚呼吸器病病原菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) の分離・同定法

試験開始前後に罹病動物の死亡またはと殺例の肺病変部を培養し、起因菌の分離同定を行う。遠隔地で分離を行う場合、臓器は病変部を境界部を含み大きく採材し、ドライアイスを含め、冷凍下 (-20°C) で輸送する。後日培養に供する場合は、 -70°C 以下に凍結保存しておく。

培養¹⁾は、材料 (約 1 cm^2) を鋏で細切した後、ガラス製ホモジナイザー等を用い BHL 液体培地で乳剤とする。1,000 rpm, 5 分間遠沈した上清 1 ml と抗 *M. hyorhinis* ウサギ血清を 1:100 に含む BHL 液体培地 1 ml とを混合し 4°C に一夜放置しておく。翌日, 1,000 rpm, 5 分間遠沈した上清 0.2 ml を抗 *M. hyorhinis* ウサギ血清を含む BHL 液体培地 1.8 ml で 10 倍段階希釈した後、 37°C で 4 週間培養する。3~5 日毎に観察し、pH の低下 (培地の黄変) したものを継代すると同時に M-agar に接種して 37°C で 3 日間培養し、集落

を形成しないことを確認する。

分離菌の同定は、代謝阻止試験²⁾により行う。菌の保存は BHL 液体培地に増殖後、20% DMSO を等量加え密栓後、 -70°C で保存する。

参考文献

- 1) 山本孝史. 1988. プタ由来マイコプラズマの培地と分離培養. マイコプラズマとその実験法 (尾形 学監修). 341-344, 近代出版, 東京.
- 2) 永友寛司. 1988. 代謝阻止試験. マイコプラズマとその実験法 (尾形 学監修). 410-412, 近代出版, 東京.

牛呼吸器病病原菌 (*Pasteurella multocida*, *P. haemolytica*) の分離・同定法

試験開始前に肺炎症状を呈した罹病動物の鼻腔拭い液又は死亡例の病変部 (気管粘膜, 肺, 肺門リンパ節など) を培養し、起因菌の分離同定を行う。

鼻腔の採材は、滅菌綿棒を挿入し、回転させながら粘液を採取する。遠隔地で分離を行う場合、綿棒拭い液は輸送培地 (トランスワブ・シードスワブなど) に綿棒ごと穿刺する。輸送中は冷蔵する (冷凍不可)。臓器は病変部を境界部を含み大きく採材し、冷凍下 (-20°C) で輸送する。

培養は、材料を5%馬血液加寒天培地、それにバンコマイシン (30 mg/l) を添加した培地 (材料が汚染している場合)、あるいは β -NADH 加 HP 基礎培地 (北研) に塗抹し、 37°C で 24~48 時間行う。

分離菌の同定は、集落性状及びグラム染色から菌形を確認した後、生物学的性状検査¹⁾を行う。菌の保存はトリプトソイブイオンに5%馬血清 (他の動物血清でもよい) を加えた培地に、できるだけ多数懸濁させ、密栓後、 -80°C で保存する。

参考文献

- 1) 全国家畜衛生職員会. 1985. 牛のパスツレラ症. 62-63, 病性鑑定マニュアル (農水省畜産局監修), 東京.

牛呼吸器病病原菌 (マイコプラズマ) の分離・同定法

試験開始前に肺炎症状を呈した罹病動物の、鼻

腔拭い液又は死亡例の気管，肺病変部を培養し，起因菌の分離・同定を行う。

鼻腔拭い液の採材は，滅菌綿棒を挿入し，回転させながら粘液をできるだけ多く採取する。分離用液体培地，Hayflick の液体培地（*M. dispar* は GS 液体培地，ウレアプラズマは T-broth）の中で，採材した検体をすすぎ落とす。綿棒は柄を折ってそのまま培地に漬けておく。遠隔地で分離を行う場合，鼻腔拭い液及び臓器は冷凍下でドライアイスを含め検査機関へ送付する。ウレアプラズマでは鼻腔拭い液は冷蔵下で検査機関へ送付し 24 時間以内に培養に供する。

培養^{1,2)}は，肺では鋏で細切した後，ホモジナイザー等を用い 10～20 倍容の基礎培地で乳剤とする。ウレアプラズマでは 5 倍容の液体培地で乳剤とする。鼻腔拭い液及び肺乳剤は Hayflick の液体培地（*M. dispar* は GS 液体培地）で 10 倍段階希釈した後，各希釈の 10 μ l 又は 100 μ l ずつをそれぞれの固形培地の表面に滴下又は塗布し，5% CO₂下，37°Cで 3～10 日間培養する。2～3 日おきに集落の発育を観察し，なるべくコロニー形態の異なるものから数株ずつクローニングを行う。ウレアプラズマの場合は，同様に T-broth で 7～8 管 10 倍段階希釈し，37°Cに静置する。観察は 1 日 2～3 回行い，pH の上昇の認められたものはその一部を取り，さらに 10 倍段階希釈培養を繰り返す方法で分離する。

分離菌の同定は，代謝阻止試験³⁾により行う。菌の保存は各液体培地で培養後，DMSO を等量加え（ウレアプラズマではそのまま）密栓後，-70°Cに保存する。

参考文献

- 1) 清水高正，1988. ウシ由来マイコプラズマの培地と分離培養. マイコプラズマとその実験法(尾形 学監修). 344-347, 近代出版, 東京.
- 2) 橋本和典，1988. ウレアプラズマの培地と分離培養. マイコプラズマとその実験法(尾形 学監修). 347-351, 近代出版, 東京.
- 3) 永友寛司，1988. 代謝阻止試験. マイコプラズマとその実験法(尾形 学監修). 410-412, 近代出版, 東京.

豚・牛下痢病原菌 (*Escherichia coli*) の分離・同定法

試験開始前に下痢の症状を呈した複数の罹患動物の直腸便，直腸スワブ，新鮮な排泄便，及び死亡例またはと殺例の腸粘膜の搔爬片，腸内容を培養し，起因菌の分離同定を行う。遠隔地で分離を行う場合，冷蔵下（4°C）で輸送する。

培養は，材料を DHL 寒天培地を用い定量培養して行う。37°Cで 24 時間培養する。

分離菌の同定は，集落及びグラム染色から菌形を確認した後，生物学的性状検査^{1,2)}を行う。また，必要に応じて，分離大腸菌の組織侵入性 (InvE)，易熱性エンテロトキシン (LT)，耐熱性エンテロトキシン (ST)，Vero 細胞毒 (VT 1 および VT 2) 産生能，O 血清型，腸管付着因子の有無などを調査する。菌の保存はトリプトソイブイオンに 5% 馬血清（他の動物血清でもよい）を加えた培地に，できるだけ多数懸濁させ，密栓後，-80°Cで保存する。

参考文献

- 1) 全国家畜衛生職員会，1985. 豚の大腸菌性下痢. 160-161, 病性鑑定マニュアル（農水省畜産局監修），東京.
- 2) 全国家畜衛生職員会，1985. 牛の大腸菌性下痢. 84-85, 病性鑑定マニュアル（農水省畜産局監修），東京.

付記 2. 薬剤感受性試験法

豚呼吸器病病原菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) の薬剤感受性試験法

分離株のうち各個体当たり 2～3 株ずつについて薬剤感受性試験を行う。参照菌株としてすでに感受性試験成績が報告されている株を用いる。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は動物用抗菌剤研究会報に発表^{1,2)}された方法（下記）を参考に行う。

以下の項目以外の術式は，動物用抗菌剤研究会標準法³⁾に準ずる。

(1) 感受性測定用寒天培地：

Mueller-Hinton agar (Difco, 栄研) に β -NADH を 25 μ g/ml 添加した培地。

(2) 感受性測定用接種菌の培養

Mueller-Hinton broth (Difco) に β -NADH を 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した培地で 37°C, 6~18 時間行う。

(3) 感受性測定用寒天培地への接種菌量

培養菌液を生理食塩液又は PBS で 1,000 倍に希釈し、菌数が約 $10^5 \sim 10^6 \text{CFU}/\text{ml}$ になるよう調整し、接種装置 (multi-inoculator; 佐久間, 武藤, Gathra 製等) を用いて接種する (この場合, 実際に寒天平板培地に接種される菌量は約 $10^{2-3} \text{CFU}/0.003$ または 0.005 ml である)。

但し, 上記の培養法で発育が不十分とみなされる菌株 (その多くは変異株である) の培養菌液は約 100 倍に希釈して接種する。

参考文献

- 1) 家畜抗菌剤研究会. 1989. 豚由来 *Haemophilus pleuropneumoniae* の薬剤感受性. 家畜抗菌研報, 10, 6-30.
- 2) 山本孝史. 1989. 豚由来 *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* の薬剤感受性に及ぼす培地および接種菌量の影響について. 家畜抗菌研報, 10, 31-33.
- 3) 動物用抗菌剤研究会. 1997. 動物由来の細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (動物用抗菌剤研究会標準法). 動物用抗菌研報, 18, 40-41.

豚呼吸器病原菌 (*Pasteurella multocida*) の薬剤感受性試験法

分離株のうち各個体当たり 2~3 株ずつについて薬剤感受性試験を行う。参照菌株としてすでに感受性試験成績が報告されている株を用いる。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は動物用抗菌剤研究会報に発表¹⁾された方法 (下記) で行う。

以下の項目以外の術式は、動物用抗菌剤研究会標準法²⁾に準ずる。

- (1) 感受性測定用寒天培地: 次のいずれかを使用する。

Dextrose starch agar (Difco)
Mueller-Hinton agar (Difco, 栄研)

- (2) 感受性測定用接種菌の培養

Mueller-Hinton broth (Difco) にて 37°C, 18~24 時間行う。

- (3) 感受性測定用寒天培地への接種菌量

培養菌液を生理食塩液または PBS で 1,000 倍に希釈し、菌数が約 $10^6 \text{CFU}/\text{ml}$ になるよう調整し、接種装置 (multi-inoculator; 佐久間, 武藤, Gathra 製等) を用いて接種する (この場合, 実際に寒天平板培地に接種される菌量は約 $10^3 \text{CFU}/0.003$ または 0.005 ml である)。

但し, 上記の培養法で発育が不十分とみなされる菌株 (その多くは変異株である) の培養菌液は約 100 倍に希釈して接種する。

参考文献

- 1) 家畜抗菌剤研究会. 1990. 家畜・家禽由来 *Pasteurella multocida* 薬剤感受性測定法. 家畜抗菌研報, 11, 32.
- 2) 動物用抗菌剤研究会. 1997. 動物由来の細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (動物用抗菌剤研究会標準法). 動物用抗菌研報, 18, 40-41.

豚呼吸器病病原菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) の薬剤感受性試験法

分離株のうち各個体当たり 2~3 株ずつについて薬剤感受性試験を行う。参照菌株としては各基準株などすでに感受性試験成績が報告されている株を用いる。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は動物用抗菌剤研究会報に発表¹⁾された方法 (下記) を参考に試験管ブイヨン希釈法で行う。

マイクロプレート (平底) を用い、全量 0.2 ml とする。

- (1) 感受性測定用培地:

BHL 液体培地。

- (2) 感受性測定用接種菌の培養

BHL 液体培地で 37°C, 3~5 日間培養後, 20% に DMSO を含む同培地と等量混合後, -70°C に保存する。

- (3) 感受性測定用培地への接種菌量

保存菌液を凍結融解後, BHL 液体培地で希釈し、菌数が約 $10^6 \sim 10^7 \text{CFU}$ 又は CCU/ml になるよう調整し、その 0.1 ml ずつを、各薬剤の BHL 液体培地希釈液 0.1 ml に接種する。薬剤及び菌液の希釈は、あらかじめ試験管内で実施する。

接種後プレートは蓋と本体をビニールテープで密閉し、37°C で培養する。

(4) 判定

薬剤無添加の菌接種対照培地で、同一菌株が発育した時点で発育阻止の認められた薬剤濃度を Initial MIC とする。Final MIC の判定は Initial MIC の判定日から3日後とし、これを MIC 値とする。

参考文献

- 1) 山本孝史・跡部ヒサエ. 1985. 豚由来マイコプラズマの MIC 測定法に関する検討. 家畜抗菌研報, 6, 9-13.

牛呼吸器病病原菌 (*Pasteurella multocida*, *P. haemolytica*) の薬剤感受性試験法

分離株のうち各個体当たり2～3株ずつについて薬剤感受性試験を行う。参照菌株としてすでに感受性試験成績が報告されている株を用いる。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は動物用抗菌剤研究会報に発表¹⁾された方法 (下記) で行う。

以下の項目以外の術式は、動物用抗菌剤研究会標準法²⁾に準ずる。

- (1) 感受性測定用寒天培地：次のいずれかを使用する。

Dextrose starch agar (Difco)

Mueller-Hinton agar (Difco, 栄研)

- (2) 感受性測定用接種菌の培養

Mueller-Hinton broth (Difco) にて 37°C, 18～24 時間行う。

- (3) 感受性測定用寒天培地への接種菌量

培養菌液を生理食塩液又は PBS で 1,000 倍に希釈し、菌数が約 10⁶CFU/ml になるよう調整し、接種装置 (multi-inoculator; 佐久間, 武藤, Gathra 製等) を用いて接種する (この場合, 実際に寒天平板培地に接種される菌量は約 10³CFU/0.003 または 0.005 ml である)。

但し, 上記の培養法で発育が不十分とみなされる菌株 (その多くは変異株である) の培養菌液は約 100 倍に希釈して接種する。

参考文献

- 1) 家畜抗菌剤研究会. 1990. 家畜・家禽由来 *Pasteurella multocida* 薬剤感受性測定法. 家畜抗菌研報, 11, 32.
- 2) 動物用抗菌剤研究会. 1997. 動物由来の細菌に対す

る薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (動物用抗菌剤研究会標準法). 動物用抗菌研報, 18, 40-41.

牛呼吸器病病原菌 (マイコプラズマ) の薬剤感受性試験法

分離株のうち各個体当たり2～3株ずつについて薬剤感受性試験を行う。参照菌株としては各基準株などすでに感受性試験成績が報告されている株を用いる。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は動物用抗菌剤研究会報に発表¹⁾された方法を参考に寒天平板あるいは試験管ブイオン希釈法で行う。ウレアプラズマはコロニーが見にくいので後者のほうが望ましい。

寒天平板希釈法

以下の項目以外の術式は、動物用抗菌剤研究会標準法²⁾に準ずる。

- (1) 感受性測定用寒天培地：

Hayflick の寒天培地 (*M. dispar* は GS 寒天培地)

- (2) 感受性測定用接種菌の培養

各液体培地にて 37°C, 24 時間行う。

- (3) 感受性測定用寒天培地への接種菌量

培養菌液を各液体培地で希釈し、菌数が約 10⁶CFU/ml になるよう調整し、接種装置 (multi-inoculator; 佐久間, 武藤, Gathra 製等) を用いて接種する (この場合, 実際に寒天平板培地に接種される菌量は約 10³CFU/0.003 または 0.005 ml である)。

- (4) 判定

3～5 日後, 顕微鏡で接種部位に典型的な集落が認められたものを陽性とする。異型小集落は発育阻止と判定する。

試験管ブイオン希釈法

マイクロプレートを用い, 全量 0.2 ml とする。

- (1) 感受性測定用培地：

Hayflick の液体培地 (*M. dispar* は GS 液体培地, ウレアプラズマは T-broth)。培地は供試菌種によってはグルコース (0.5%), アルギニン (1%), ウレア (0.1%), TTC (0.05%), この場合は指示薬は除く) のいずれかを加える。ウレアプラズマの場合は pH 6.2, その他は pH 7.2 とする。

(2) 感受性測定用の接種菌の培養

各液体培地で 37°C, 3~5 日間培養後, 10% に DMSO を含む同培地と等量混合後 (ウレアプラズマは pH 7.0~7.4 に赤変したものをそのまま), -70°C に保存する。

(3) 感受性測定用培地への接種菌量

保存菌液を凍結融解後, 各液体培地で希釈し, 菌数が約 $10^3 \sim 10^4$ CFU または CCU/ml になるよう調整し, その 0.1 ml を各薬剤を含む液体培地希釈液 0.1 ml に接種する。なお, 薬剤及び菌液の希釈は, あらかじめ試験管内で実施する。

接種後, プレートは蓋と本体をビニールテープで密閉し, 37°C で培養する。

(4) 判定

薬剤無添加の菌接種対照培地で, 同一菌株が発育した時点で発育阻止の認められた薬剤濃度を Initial MIC とする。Final MIC の判定は Initial MIC の判定日から 3 日後とし, これを MIC 値とする。

参考文献

- 1) 清水高正・永友寛司・末石哲之・村川泰司. 1985. 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。家畜抗菌研報, 6, 1-8.
- 2) 動物用抗菌剤研究会. 1997. 動物由来の細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (動物用抗菌剤研究会標準法)。動物用抗菌研報, 18, 40-41.

豚・牛下痢病原菌 (*E. coli*) の薬剤感受性試験法

分離株のうち各個体当たり 2~3 株ずつについて薬剤感受性試験を行う。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は動物用抗菌剤研究会標準法¹⁾で行う。

参考文献

- 1) 動物用抗菌剤研究会. 1997. 動物由来の細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (動物用抗菌剤研究会標準法)。動物用抗菌研報, 18, 40-41.

付記 3. 統計学的検定法

治験成績を統計学的に解析する場合は, 検定対象の母集団の分布様式を推定し, 適切な統計検定法を選択しなければならない。

1. 標本分布が特定できるデータの場合: パラメトリックな統計検定

1) 正規分布: 体重, 体温, 血清や尿の生化学値, 採食量 (飼養効率), 糞尿排泄量などは正規分布することがわかっており, 平均と標準偏差というパラメーターで標本の分布を表せる。このような場合は, パラメトリックな統計検定法で検定する。

t 検定, f 検定, ANOVA 検定などが代表的なパラメトリックな検定法である。

2) 二項分布: 疾病の発生, 処置による治癒, 生死など all or nothing なデータは二項分布することがわかっているから, χ^2 検定又は直接確率法で検定する。

3) その他特殊な分布が知られている試験データについては, そのための統計検定法があればそれを採用し, ない場合は次のノンパラメトリックな検定法を使う。

2. 一定の分布様式がないデータの場合: ノンパラメトリックな統計検定

病状の重篤度, 症状改善の程度, 副作用症状の強さ, 脱水の程度の臨床判断, 下痢便の外見上の流動性など, 数値で表せない現象を +++, ++, +, ±, - とか, 著効, 有効, 無効などのカテゴリー分類でその程度を表す場合, それらは何らかの方法で数値化して平均値や標準偏差を出しても, 元になる母集団の分布に一定の分布様式がないから, 無意味である。このような場合にはノンパラメトリックな統計検定法を使う。

ノンパラメトリックな統計処理の代表は, Wilcoxon 検定と Mann-Whitney 検定である。同一個体で処置前と処置後のデータ (対応のあるデータ) がある場合は, Wilcoxon 検定, 動物を試験群と対照群に分けて試験した時のデータのように, 対応のないデータの処理には Mann-Whitney 検定が適切である。

3. 分布様式が判断できないデータの統計検定

データによっては分布様式が判断できない場合がある。このような時にはノンパラメトリックな処理法で検定する。また, 本来パラメトリックな標本集団でも, ノンパラメトリックな統計検定法で検定することは統計学的に間違いではないし,

試験そのものの価値を損なうものでもない。

4. 以上の記載はあくまでも指針であって、臨床試験項目と統計検定法を対にしているのではない。例えば、2つの群の体温や血清抗体価を比較する場合、単純に集団の体温や抗体価の高低をt検定するのが適当な場合もあるし、体温や抗体価が一定値を越えたことに臨床的な意味を見いだし、一定値を越えた個体数の率を比較するために

χ^2 検定するのが適切な場合もある。また、ノンパラメトリックな検定の方がより試験内容を的確に表すと判断できれば、パラメトリックな検定結果とノンパラメトリックな検定結果を併記するのも一考である。大切なことは、統計検定することによって、データにより客観的な説得力を持たせることである。