

1969～1971年に分離された *Mycoplasma gallisepticum* の 主な抗生物質感受性

村田昌芳・梶川道治・国安主税*†・吉田佳充*

広島大学生物生産学部 衛生微生物学講座
*農林水産省家畜衛生試験場
1980年4月30日 受理

Sensitivity *in vitro* of *Mycoplasma gallisepticum* Isolated from Chickens and Eggs in 1969-1971 to Some Antibiotics

Masayoshi MURATA, Michiharu KAJIKAWA, Chikara KUNIYASU*† and Yoshimitsu YOSHIDA*

Department of Microbiology and Hygiene, Faculty of Applied Biological Science,
Hiroshima University, Fukuyama 720, and *National Institute of Animal Health,
Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305

(Fig. 1, Tables 1-6b)

Mycoplasma gallisepticum (MG) は鳥類由来マイコプラズマの代表的な一種で、鶏と七面鳥の呼吸器性マイコプラズマ病 (avian respiratory mycoplasmosis) の病原体としてよく知られている^{2,9,13,30)}。

鶏の呼吸器性マイコプラズマ病はMGが一次的原因となって起こる疾病ではあるが、その重篤度の度合いは二次感染菌の有無に左右されるものとされている^{9,12,13,19,30)}。

MG感染症の予防・治療は、一部では免疫学的方法すなわちワクチンが開発されつつある^{1,10,22,27,30)} もの、現在なお一般には鶏の飼養管理や環境衛生の整備、あるいは化学療法剤に依存せざるをえないのが実状である。

MGと化学療法剤、とくに抗生物質との関係はきわめて重要な問題である。それらの抗生物質については、鶏の呼吸器性マイコプラズマ病に限らず他のマイコプラズマ感染症の予防や治療に大きな貢献をしてきた反面、耐性菌の出現という宿命のかつ困難な問題が必然的に起こっている事は、一般の細菌感染症におけると同様である^{9,17,18,21,28)}。

MGについても、種々の抗生物質その他の化学療法剤に対する *in vitro* における感受性に関し、またその *in vivo* での予防治療効果に関しても多数の報告がなされて来た^{4-7,14,15,20,21,29)}。

松井ら (1966)^{12,13)} は、1962～1964年の間にわが国で分離された6株のMGについて25種の薬剤に関する *in vitro* での感受性を調べた。その結果それら全菌株とも、spiramycin (SPM) および tylosin (TS) に対し高い感受性を示す事を報告した。また NEWNHAM および CHU (1965)¹⁸⁾ もイギリスとアメリカで分離された20株のMGについて検討し、同様な成績を得たと述べた。

その後国安ら^{10,11)} は、1969年に種鶏および死ごもり卵から分離された27株のMGについて、SPMとTSに対する *in vitro* での、またそれらのうちの1株についてはヒナの実験感染における *in vivo* での感染阻止効果を検討した。そして、これらの供試菌株においては松井ら (1966)、NEWNHAM および CHU

† 現：家畜衛生試験場北海道支場，札幌市羊ヶ丘4 (〒061-01)

Present address: Hokkaido Branch Laboratory, National Institute of Animal Health, Hitsujigaoka, Sapporo, Hokkaido 061-01.

(1965)の成績に比べて、特にSPMおよびTSに対する耐性が、1,000～10,000倍高くなっている事を示した。また、彼らは同時に *in vivo* においてもそれらの耐性MG株による鶏実験感染に対し上記薬剤による感染阻止が困難である事を指摘し、以上の現象は、わが国において過去数年間に、SPMとTSが野外で多用されて来た為であろうと考察した。

また、1971年高橋ら²⁶⁾も野外鶏および卵由来の40株のMGについて種々の抗生物質に対する *in vitro* での感受性を調べ、マクロライド系薬剤に対するMG株の耐性化が進んでいる事を指摘した。

以上の事に関連して、すでにGRIFFINら⁵⁾も鶏のマイコプラズマ感染症に対する予防・治療には、薬剤の耐性獲得の面から使用薬剤を変える必要があると指摘した。

そこで本実験では、以上の事を背景として1969～1971年の間にわが国の各地で分離された85株および参考菌株4株のMGについて、主要抗生剤5剤すなわちTS、SPM、SPCT、TCおよびCPに対する *in vitro* での感受性を調べた。そして、それらMG株の薬剤耐性度とその分布を明らかにし、その成績を従来の報告のそれと比較検討し、今後のMG感染症の防遏に資する事を目的として、以下に述べる実験を行った。

材料と方法

供試菌株：供試菌株は、農林水産省家畜衛生試験場、国安の下に収集された成鶏および死ごもり卵由来の85株と参考菌株4株のMGである。これらの供試菌85株はTable 1に示した通り、1969～1971年に分離され、分離地域別に分類されている。

参考菌株の由来については下記のとおりである。

菌株K P - 13：1962年、佐藤ら²³⁾により神奈川県成鶏から分離された。

Table 1. Group and origin of *M. gallisepticum* strains examined.

Group of strains*	Source	Number of strains	Date of origin
Group 1	Pipped eggs** in Yokohama	25	21 --- 1969
			4 --- 1970
Group 2	Pipped eggs** in Sagami-hara	13	11 --- 1969
			2 --- 1970
Group 3	Pipped eggs in Tochigi	6	5 --- 1969
			1 --- 1970
Group 4	Adult chickens in Saga	10	26 --- 1969
	Pipped eggs	17	
Group 5	Adult chickens in Shizuoka Aichi Chiba unknown	7	14 ----- 1969
		2	
		1	
		4	

* Derived from medicated flocks.

** Dipped in tylosin solution before incubation.

菌株 1 R F : 1965 年, 佐藤らにより大分県の中灘から分離された^{14,19,22)}。

菌株 S P - 23 G : 国安ら¹¹⁾により菌株 K P - 13 を S P M 加培地で 23 代継代されたもの。

菌株 T S - 18 G : 国安ら¹¹⁾により菌株 K P - 13 を T S 加培地で 18 代継代されたもの。

供試薬剤 : 下記の薬剤を用いた。全薬剤とも作用機序はタンパク合成阻害である。

tylosin (T S) : 動物用タイロシン 200, 注射液, Lot No. 0020, 200 mg 力価/ml, 武田薬品工業。

spiramycin (S P M) : 動物用スピラマイシン注射液, 協和 50, Lot No. SPL 137B 1, 50 mg 力価/ml, 協和醗酵。

spectinomycin dihydrochloride pentahydrate (S P C T) : Code 68250, Lot No. 8122101, 670 mg 力価/mg (製剤), Abbott Lab., Chicago.

tetracycline hydrochloride (T C) : 1 mg 力価/mg, 武田薬品工業。

chloramphenicol (C P) : Lot No. 953a, 1 mg 力価/mg, 三共。

薬剤希釈方法 : 各薬剤の希釈系列は, half log. method²⁴⁾ により行った。各薬剤を秤量し, 滅菌精製水を用いてそれぞれ 1,000 μ g 力価/ml に調製した。ただし, C P は水に不溶な為, 精製水のかわりに dimethyl sulfoxide を用いた。次にこれらの所定濃度の各薬剤溶液を滅菌精製水を用いて 10 倍希釈列を調製した。次いで, 各薬剤の 1,000 μ g/ml 溶液と滅菌精製水を, 3 : 7 の比に加えて 300 μ g 力価/ml の希釈液とし, さらにその 10 倍希釈列を調製した。このようにして, 各薬剤について 2 系列の希釈液を準備した。

各薬剤の希釈液は, 薬剤の効力持続時間を考慮して培地への菌接種直前に調製し, 試験系全量に対し薬剤希釈液を 10% の割合になるように加え, 最終濃度がそれぞれ 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, および 0.1 μ g 力価/ml になるよう調製し, 実験に供した。

すなわち, 試験系の実験としては, 1 小試験管当たり培地 1.6 ml, 所定の供試薬剤希釈液 0.2 ml 及び供試菌液 (各菌株の発育程度を ccu で同一にそろえたもの) 0.2 ml を加えた。

培地^{13,16)} : M G の継代, 元培養および薬剤感受性試験のための培地としては, ニワトリ P P L O 培地 (栄研, ペニシリン無添加) を用いた。

最小発育阻止濃度の測定^{8,20,25)} : 今回の実験では, 液体培地希釈法 (broth dilution method) により測定した。

接種菌としては, 前述の液体培地に各供試菌株を接種し, 37°C で 24 ~ 48 時間培養したものをを用いた。この際, 接種菌の発育程度は ccu (color changing unit) によって, 概ね同一になるようにそろえた。その菌数は概略 10⁵ CFU/ml であった¹⁶⁾。

以上の試験系 (培地, 薬剤, 菌) は 37°C で 5 日間好気性培養を行った。結果の観察は培養後それぞれ 1, 3 および 5 日に行った。ただし, T C については, 薬剤力価の低下が早いので培養 1 および 2 日後に結果を観察した。その際, 菌発育の有無の判定には M G 発育による培地の黄変, ならびに本黄変培地から寒天平板培地への移植・培養による M G 集落の発育等の有無を指標とした。そして発育阻止がみられた薬剤の最低濃度を最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) とした。

なお, これらの実験は 2 および 3 回繰り返して行い, その平均値を求めた。

成 績

1) 第 1 群菌の MIC : 第 1 群の各菌株ごとの各薬剤についての MIC パターンは, Table 2a に示すとおりである。T S についてみると, 76% の菌株が 10 μ g 力価/ml (以下“力価”は省略) に, 20% の菌株が 30 μ g/ml に, そして残り 4% の菌株が 3 μ g/ml を示した。S P M については, 100% の菌株が 100 μ g/ml 以上を示した。S P C T については, 80% の菌株が 10 μ g/ml に, 16% の菌株が 3 μ g/ml に, そして残り 4% の菌株が 30 μ g/ml を示した。T C については, 84% の菌株が 1 μ g/ml に, 12% の菌株が 0.3 μ g/ml に, そして残り 4% が 3 μ g/ml を示した。C P については, 80% の菌株が 10 μ g/ml に, 12% の菌株が 3 μ g/ml に, そして残り 8% の菌株が 30 μ g/ml を示した。

Table 2a に示した菌株のうち, 菌株 325, 334, 338, 645 および 682 は, いずれも T S による MIC は,

30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という高い値を示した。

また、これらの成績を各薬剤ごとに濃度別の MIC に占める第 1 群菌株数の割合をまとめると Table 2b に示したとおりである。

Table 2a. Distribution and pattern of antibiotic sensitivity* *in vitro* of group 1 strains.

STRAINS Group and Number	ANTIBIOTICS Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	TS†				SPM				SPCT				TC				CP			
		0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
Strain 325**				•					•				•				•				•
<u>GROUP 1</u>				•					•				•				•				•
25 STRAINS	334			•					•				•				•				•
	338			•					•				•				•				•
FROM				•					•				•				•				•
PIPPED EGGS				•					•				•				•				•
IN				•					•				•				•				•
YOKOHAMA	645			•					•				•				•				•
	682			•					•				•				•				•
1969, 1970				•					•				•				•				•
Percent in number of strains (25)		76				100				80				84				80			
		20								16				12				12			
		4								4				4				8			

* Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) *in vitro* of antibiotics to *M. gallisepticum*.

† Refer to materials and methods.

** Strain represented aberrant pattern of sensitivity.

Table 2b. Distribution of minimum inhibitory concentration *in vitro* of antibiotics to group 1 strains.

GROUP OF STRAINS	ANTIBIOTICS	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
		<0.1	0.1	0.3	1	3	10	30	100	100<
<u>GROUP 1</u>	TYLOSIN					4*	76	20		
25 STRAINS	SPIRAMYCIN									100
FROM										
PIPPED EGGS	SPECTINOMYCIN					16	80	4		
IN										
YOKOHAMA	TETRACYCLINE			12	84	4				
1969, 1970										
	CHLORAMPHENICOL					12	80	8		

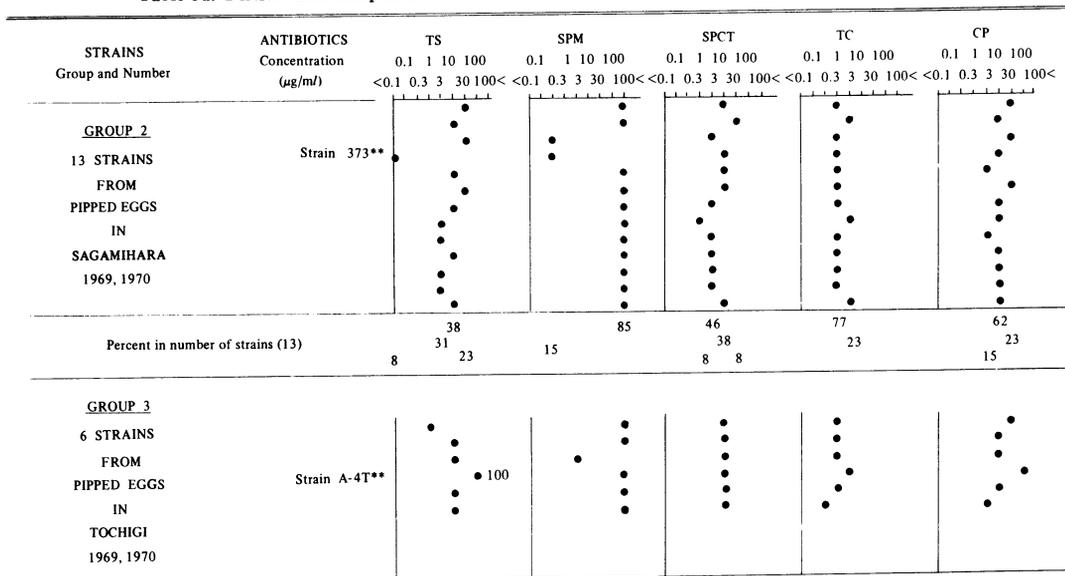
* Percent in number of strains.

2) 第 2 群菌の MIC : 第 2 群の各菌株ごとの各薬剤についての MIC パターンは、Table 3a の上段に示したとおりである。TS についてみると、38% の菌株が 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、31% の菌株が 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、23% の菌株が 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、そして残り 8% の菌株が 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下を示した。すなわち、これら 92% の菌株が 3 ~ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内に分布した。SPM については、85% の菌株が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上に、15% の菌株が 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。SPCT については、46% の菌株が 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、38% の菌株が 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

に、そして8%ずつの菌株がそれぞれ3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。すなわち、これら84%の菌株3~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内に分布した。TCについては、77%の菌株が1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、そして残り23%の菌株が3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。CPについては、62%の菌株が10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、23%の菌株が30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、そして残り15%の菌株が3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。菌株373は、TSによるMICは0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下という低い値を示した。

また、これらの成績を各薬剤ごとに濃度別のMICに占める第2群中の菌株数の割合をまとめるとTable 3bに示したとおりである。

Table 3a. Distribution and pattern of antibiotic sensitivity* *in vitro* of group 2 and 3 strains.



* Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) *in vitro* of antibiotics to *M. gallisepticum*.
 ** Strain represented aberrant pattern of sensitivity.

Table 3b. Distribution of minimum inhibitory concentration *in vitro* of antibiotics to group 2 strains.

GROUP OF STRAINS	ANTIBIOTICS	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
		<0.1	0.1	0.3	1	3	10	30	100	100<
	TYLOSIN		8*				31	38	23	
GROUP 2										
13 STRAINS	SPIRAMYCIN				15					85
FROM										
PIPPED EGGS	SPECTINOMYCIN					8	46	38	8	
IN										
SAGAMIHARA	TETRACYCLINE				7	7	23			
1969, 1970										
	CHLORAMPHENICOL						15	62	23	

* Percent in number of strains.

3) 第3群菌のMIC: 第3群の各菌株ごとの各薬剤についてのMICパターンは、Table 3aの下段に示したとおりである。第3群は、菌株総数が少ない為各薬剤のMICに占める割合は求めなかった。菌株A-4Tは、TSについて100 µg/ml、CPについて100 µg/mlという高い値を示した。他の菌株のMICパターンは、第2群菌と概ね同様であった。

ただし、Table 6a,b およびFig. 1の第1~5群全菌株に関する成績の総括の項には、それらの菌株についての成績も含めて示した。

4) 第4群菌のMIC: 第4群の各菌株ごとの各薬剤についてのMICパターンは Table 4a に示したとおりである。TSについてみると、30%の菌株が30 µg/mlに、26%の菌株が3 µg/mlに、15%の菌株が10 µg/mlに、11%の菌株が0.1 µg/ml以下に、7%ずつの菌株が0.3 µg/mlおよび1 µg/mlに、そして残り4%の菌株が100 µg/mlを示した。SPMについては、30%ずつの菌株がそれぞれ1 µg/mlおよび100 µg/ml以上に、11%ずつの菌株が3 µg/mlおよび100 µg/mlに、7%ずつの菌株が0.3 µg/mlおよび30 µg/mlに、そして残り4%の菌株が10 µg/mlを示した。SPCTについては、59%の菌株が10 µg/mlに、30%の菌株が3 µg/mlに、そして残り11%の菌株が30 µg/mlを示した。すなわち、100%の菌株が3~30 µg/mlの範囲内に分布した。TCについては、85%の菌株が1 µg/mlに、11%の菌株が3 µg/mlに、そして残り4%の菌株が0.3 µg/mlを示した。CPについては、63%の菌株が30 µg/mlに、33%の菌株が10 µg/mlに、そして残り4%の菌株が100 µg/mlを示した。成鶏から分離された菌株のうちS-6T、S-7SおよびS-8Tはいずれも、TSによるMICは0.1 µg/ml以下という低い値を示した。一方、死ごもり卵から分離されたS-15Pは、TSおよびCPのMICについて100 µg/mlという高い値を示した。

また、これらの成績を各薬剤ごとに濃度別のMICに占める第4群菌株数の割合をまとめるとTable 4bに示したとおりである。

Table 4a. Distribution and pattern of antibiotic sensitivity* *in vitro* of group 4 strains.

STRAINS Group and Number	ANTIBIOTICS Concentration (µg/ml)	TS					SPM					SPCT					TC					CP				
		0.1	1	10	100	<	0.1	1	10	100	<	0.1	1	10	100	<	0.1	1	10	100	<	0.1	1	10	100	<
		<0.1	0.3	3	30	100	<0.1	0.3	3	30	100	<0.1	0.3	3	30	100	<0.1	0.3	3	30	100	<0.1	0.3	3	30	100
FROM ADULT CHICKENS GROUP 4	Strain S-4A**	•																								
	S-6T	•																								
	S-7S	•																								
	S-8T	•																								
27 STRAINS IN SAGA FROM 1969, 1971 PIPPED EGGS	S-15P																									
	B-2Si																									
Percent in number of strains (27)		11	7	26	30		7	11	11	30		30	11	11	59		30	11	11	85		33	4	4	63	

* Minimum inhibitory concentration (µg/ml) *in vitro* of antibiotics to *M. gallisepticum*.
 ** Strain represented aberrant pattern of sensitivity.

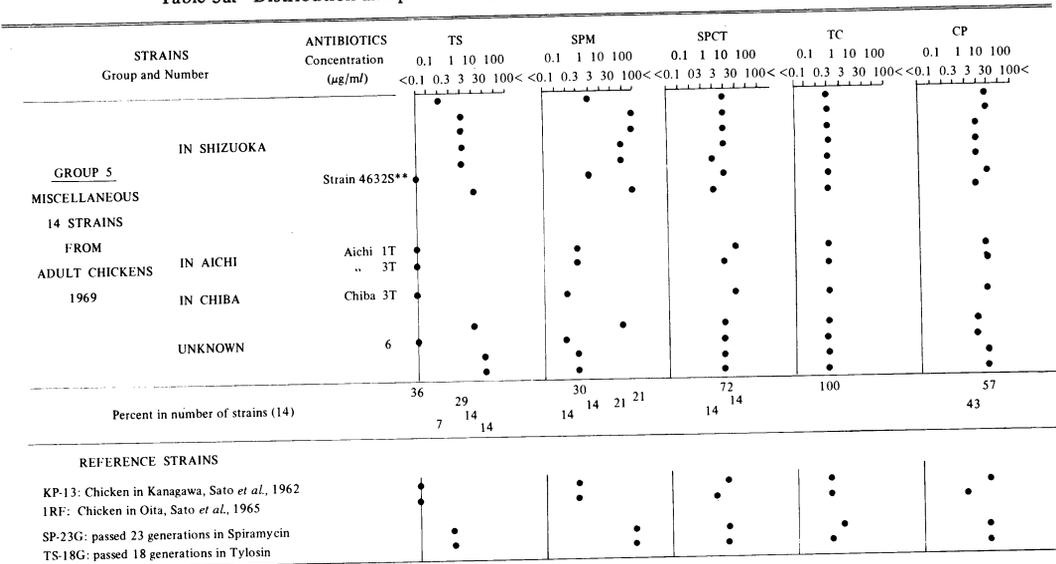
Table 4b. Distribution of minimum inhibitory concentration *in vitro* of antibiotics to group 4 strains.

GROUP OF STRAINS	ANTIBIOTICS	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)								
		<0.1	0.1	0.3	1	3	10	30	100	100<
GROUP 4 27 STRAINS FROM ADULT CHICKENS & PIPPED EGGS IN SAGA 1969, 1971	TYLOSIN	11*		7	7	26	15	30	4	
	SPIRAMYCIN			7	30	11	4	7	11	30
	SPECTINOMYCIN					30	59	11		
	TETRACYCLINE			4	85	11				
	CHLORAMPHENICOL						33	63	4	

* Percent in number of strains.

5) 第5群菌のMIC: 第5群には、それぞれ分離地域を異にし、かつ地域別菌株数の少ない菌株を集めた。それら菌株の分離地域の内訳については、実験材料としての供試菌株の項 (Table 1) ならびに Table 5a の上段に示したとおりである。本群菌についての各菌株ごとの各薬剤についてのMICパターンは、Table 5aの上段に示した。TSについてみると、36%の菌株が0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下に、29%の菌株が3 $\mu\text{g/ml}$ に、14%ずつの菌株が10 $\mu\text{g/ml}$ および30 $\mu\text{g/ml}$ に、そして残り7%の菌株が0.3 $\mu\text{g/ml}$ を示した。SPMについては、30%の菌株が1 $\mu\text{g/ml}$ に、21%ずつの菌株が100 $\mu\text{g/ml}$ および100 $\mu\text{g/ml}$ 以上に、そして14%ずつの菌株がそれぞれ0.3 $\mu\text{g/ml}$ および3 $\mu\text{g/ml}$ を示した。SPCTについては、72%の菌株が10 $\mu\text{g/ml}$ に、そして14%ずつの菌株がそれぞれ3 $\mu\text{g/ml}$ および30 $\mu\text{g/ml}$ を示した。TCについては、100%の菌株が1 $\mu\text{g/ml}$ を示した。CPについては、57%の菌株が30 $\mu\text{g/ml}$ に、

Table 5a. Distribution and pattern of antibiotic sensitivity* *in vitro* of group 5 strains.



* Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$) *in vitro* of antibiotics to *M. gallisepticum*.
 ** Strain represented aberrant pattern of sensitivity.

Table 5b. Distribution of minimum inhibitory concentration *in vitro* of antibiotics to group 5 strains.

GROUP OF STRAINS	ANTIBIOTICS	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)								
		<0.1	0.1	0.3	1	3	10	30	100	100<
GROUP 5 MISCELLANEOUS 14 STRAINS 1969	TYLOSIN	36*		7		29	14	14		
	SPIRAMYCIN			14	30	14			21	21
	SPECTINOMYCIN					14	72	14		
	TETRACYCLINE				100					
	CHLORAMPHENICOL						43	57		

* Percent in number of strains.

そして43%の菌株が10 $\mu\text{g/ml}$ を示した。静岡県由来菌株のうち4632S, 愛知県由来菌株Aichi 1Tと3Tおよび不明地域由来菌株のうち菌株6は, いずれもTSとSPMの両薬剤に対するMICは低かった。また, これらの成績を各薬剤ごとに濃度別のMICに占める第5群菌株数の割合を総括するとTable 5bに示したとおりである。

6) 参考菌株のMIC: 参考菌株の各菌株ごとの各薬剤についてのMICパターンは, Table 5aの下段に示したとおりである。TSについてみると, KP-13および1RF両菌株共にMICは0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり, 一方SP-23GおよびTS-18G株についてのMICは共に1 $\mu\text{g/ml}$ であった。SPMではそれぞれ前者が1 $\mu\text{g/ml}$, 後者が100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。他の薬剤すなわちSPCT, TCおよびCPについてのMICパターンは, 他の菌群のMICパターンと概ね同様であった。

Table 6a. Comparison and summary of distribution and pattern of antibiotic sensitivity* *in vitro* of group 1-5 strains.

Group of strains	Source	Number of strains	TS		SPM		SPCT		TC		CP	
			0.1**	1 10 100	0.1	1 10 100	0.1	1 10 100	0.1	1 10 100	0.1	1 10 100
Group 1	Pipped eggs in Yokohama	25	76***		100		80		84		80	
			<0.1	0.3 3 30 100<	<0.1	0.3 3 30 100<	<0.1	0.3 3 30 100<	<0.1	0.3 3 30 100<	<0.1	0.3 3 30 100<
Group 2	Pipped eggs in Sagami-hara	13	38		85		46		77		62	
			8	31 23	15	8 8	23	15				
Group 3	Pipped eggs in Tochigi	6	66		83		100		66		49	
			17	17	17	17	17	17	17	17		
Group 4	Adult chickens & pipped eggs in Saga	27	30		30 30		59		85		63	
			11	26 15	7 7	7 7	30 11	11	33			
Group 5	Adult chickens in Shizuoka, Aichi, Chiba, unknown	14	36		30 21		72		100		57	
			7	29 14	14 14	14 14	14 14	43				
Total group 1-5	85	39		14 62		67		85		55		
		11	19	7 7	7	24	9	36				
		4	2	1	1	8	6	7	2			

* Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$) *in vitro* of antibiotics to *M. gallisepticum*.** Concentration of antibiotics ($\mu\text{g/ml}$). *** Percent in number of strains.

Table 6b. Distribution of minimum inhibitory concentration *in vitro* of antibiotics to group 1 - 5 strains.

GROUP OF STRAINS	ANTIBIOTICS	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)								
		<0.1	0.1	0.3	1	3	10	30	100	100<
TOTAL GROUP 1 - 5	TYLOSIN	11*		4	4	19	39	21	2	
	SPIRAMYCIN			7	14	7	1	2	7	62
	SPECTINOMYCIN				1	24	67	8		
	TETRACYCLINE			6	85	9				
	CHLORAMPHENICOL					7	55	36	2	

* Percent in number of strains.

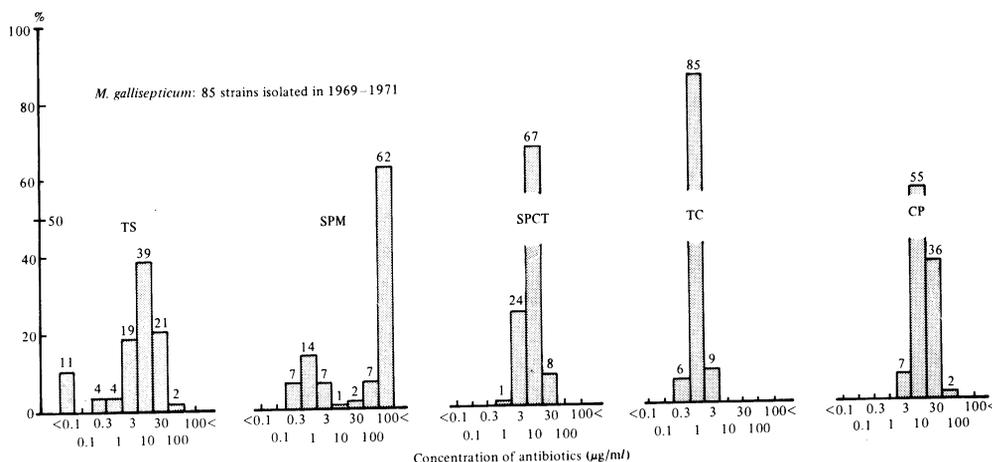


Fig. 1. Summarized results of minimum inhibitory concentration *in vitro* of antibiotics to 85 strains belonging to group 1-5 of *M. gallisepticum*.

以上のべた第1～5各菌群別の各薬剤についてのMIC分布とそのパターンの比較、ならびに第1～5全菌群についてのそれらの成績の総括は、Table 6aに示した。また第1～5全菌群の各薬剤ごとのMIC分布についての成績の総括は、Table 6bおよび Fig. 1に示した。

それら供試全菌群の総括成績から、次の事が認められた。すなわち、供試菌株の各薬剤別感受性についてみると、TSについては約80%の菌株が3～30 $\mu\text{g/ml}$ 、SPMについては約70%の菌株が100または100 < $\mu\text{g/ml}$ 、SPCTについては約90%の菌株が3～10 $\mu\text{g/ml}$ 、TCについては94%の菌株が1～3 $\mu\text{g/ml}$ 、そしてCPについては約90%の菌株が10～30 $\mu\text{g/ml}$ のそれぞれMIC値を示した。

考 察

今回の供試菌株は、国内各地の投葉養鶏場のMG感染鶏または死ごもり卵から、1969～71年に分離送付された85株で、一般MG株のMIC分布調査を目的に無作為抽出されたものではなく、由来鶏群の投葉歴・地域・株数などにやや偏りがみられ、また孵卵前にTS浸漬された死ごもり卵由来の38株(45%)も含まれた点は注意を要する。

第1群菌に対する各薬剤のMICは一般にその分布域(MIC range)が極めて狭い傾向が認められる。いずれの薬剤においてもMICはそれぞれ3濃度以内に集中しており、本群菌の各薬剤別のMICに

は高度の均一性が認められる。特にSPMのMICについてみると、全菌株において100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上に集中し、本群菌には高度の耐性が認められる。またその他の3剤すなわちTS、SPCTおよびCPのMICは、いずれも約80%の菌株に対し同一の10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の薬剤濃度に集中している事が知られる。一方、TCのMICはこれら3剤と異なり、そのMICは比較的低く1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に本群菌の84%が集中している。

第2群菌においては、各薬剤のMICはそれぞれ1濃度を中心とし、その前後の薬剤濃度に90%近い菌株が集中している。菌株373は、他の菌株と比較してTSとSPMの両薬剤に低いMICを示しているのが興味深い。それら2剤のMIC値は参考菌株のK P-13株および1RF株についてのMICと同程度の高度感受性菌であった。

第1および2群菌の各薬剤におけるMICは狭い薬剤濃度に比較的集中している。そして、菌株が集中しているMICは、NEWNHAMとCHU(1965)¹⁸⁾および松井ら(1966)^{12,13)}の成績よりも高くなっており、特にTSおよびSPMのMICはおおよそ1,000倍程度高い事が注目される。

第3群菌のMICパターンは第1および2群菌と概ね同様であった。以上の第1~3群菌は、分離地域が関東地区であり距離的に互いに近い為、これらのMICパターンが類似したものと推察される。

ただし、第3群菌中のA-4T株についてはTSおよびCPのMICは、両剤共に高度耐性100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。

第4群菌は、佐賀県において分離された菌株でその由来は成鶏および死ごもり卵に2大別される。しかし、それら由来を異にする2群間のMICパターンには大きな差は認められなかった。一方、この菌群のTSおよびSPMについてのMICパターンは第1~3群菌の同薬剤に対するMICパターンとは全く異なる傾向を示している。

第1~5群菌全菌株についての各薬剤のMICに占める菌株数の割合をまとめたTable 6a, bおよびFig. 1からわかるように、TSおよびSPMについてのMIC分布をみると第1および2群菌におけるMICは、それぞれ狭い範囲に90%前後の株が集中している。それに反し、第4群菌におけるTSのMICは<0.1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の広い範囲に分布し、30%以下の割合で菌株数は各濃度に分散している。また、同群菌に対するSPMのMICは0.3~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上という広い範囲で同様に分散している。

第4群菌では、SPCT、TCおよびCPのMICは、第1~3群菌と同程度のMICに集中している。

第4群菌(佐賀県由来)と、第1~3群菌(関東由来)におけるTSとSPMのMICについてみると、それら間で距離的に大きなひらきがあり、菌株の分離地域によって薬剤感受性の異なる事が示唆される。これは、地域によって鶏のマイコプラズマ感染症の予防治療に対する使用薬剤の種類や量などがさほど異なるとは思われないので、今後その理由について検討する必要がある。

一方、死ごもり卵由来の菌株のうちS-15P株については、TSならびにCPのMICは共に100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という高い数値を示した。

本菌株と第3群のA-4T株に限っては、TSとCPのMICは共に100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。しかし、今回の実験に用いられた他の菌株についてみると必ずしもこのような傾向はみられず、TCとCPの間に交差耐性があるとは断定できない。

第5群菌は、分離地域を異にする少数株を一括したもので、本群の特徴としてはTSのMICが比較的低いものが多く、36%の菌株が0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下を示し、愛知県由来の2株は共に0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった。本菌群も前述の佐賀県由来の第4群菌と同様にTSおよびSPMのMICは、一定濃度に集中せず広範囲に分散する傾向がみられた。

Table 6aに示したとおり、全菌群を通してみると、TSについては各菌群とも60~100%の菌株が3~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲に集中しており、全菌株の総計では約80%の菌株がその範囲を占めている。また、第1群菌を除いて8~36%の菌株が<0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示し、全菌株総計では11%の菌株が本MIC値を示した。TSのMICの分散の幅は<0.1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の広い範囲にわたっており、特に第4および5群菌においてはこの傾向が著明である。全菌株85株のMICと菌株数の関係(割合)をまとめたFig. 1をみると、この事がより一層明白である。

S P M についての M I C は、第 4 および 5 群菌についてみると、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ および 100 または $100 < \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 2 点を中心としてほぼ 30 ~ 40 % の菌株が集中している事が注目される。供試全菌株に対しての S P M の M I C は、62 % の菌株で $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の値が認められた。しかし、第 4 および 5 群菌では S P M の M I C は T S についてと同様に広い範囲に分散している。

Table 6a からわかるように、第 1 および 2 群菌についての T S および S P M の M I C 値はほぼ 1 濃度に集中しており、これに反し第 4 および第 5 群菌におけるそれは幅広く分散している。この点において、それら両菌群の成績の間には大きな差がみられる。しかし、前述のように前者も後者も両薬剤についての M I C の上限は同様である。ただし $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上での M I C は測定されていないので正確には“上限”という表現は妥当でないが、ここでは一応このように表現することにした。

今回の実験成績においては、死ごもり卵由来株に対する T S の M I C 値は、それらの菌株が由来した卵の孵卵前 T S 浸漬の有無に影響されない事が示唆された。

参考菌株の S P - 23 G 株および T S - 18 G 株に対する T S および S P M の M I C が全く同じであることを考え合わせると、T S と S P M の間に交差耐性の存在が推定される。

S P C T については、M I C の 3 ~ $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲中に殆ど全群の菌株が集中し、M I C の幅は $1 \sim 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ と狭い。なお、S P C T は一部で注目されている最近の抗生剤で、本剤についての今回の供試菌株の成績と、片江ら (1974)⁹⁾、および今回用いた参考菌株 (1 R F および K P - 13) についての成績とを比較すると、それらの M I C の間に大きな差は認められなかった。

一方、最近 G O R E N⁴⁾ が T S と S P C T 間の交差耐性について報告しているが、今回の実験では供試菌株数が少なく、またこの点についての詳細は未検討である。しかし、今回の実験成績からは、T S と S P C T の交差耐性を推定させる明確な事例は得られていない。

T C については、各菌群いずれにおいても 85 ~ 100 % の菌株の M I C が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に集中し、各群菌の総計でも 85 % の株が本濃度に集中している。またそれらの M I C の幅も $0.3 \sim 3 \mu\text{g}/\text{ml}$ と狭い。参考菌株についての T C の M I C は概ね同様で、以前の N E W N H A M と C H U¹⁸⁾ および松井ら^{12,13)} の成績と比較しても同様の M I C 値で、本薬剤の耐性は殆ど増加していない事が知られた。

C P については、いずれの菌群でも 84 ~ 96 % の菌株が M I C $10 \sim 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ の薬剤濃度に集中した。第 1 ~ 5 群全体では 91 % の菌株が本濃度に集中し、その M I C は $3 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ と幅広く分散している。参考菌株についての C P の M I C は概ね同様で、N E W N H A M と C H U¹⁸⁾ および松井ら^{12,13)} の成績と比較しても大差ないといえる。

一般に、T C 系抗生物質と C P 間には交差耐性が成立するといわれている²⁸⁾。今回の実験で両薬剤の M I C パターンが類似しており、限られた範囲の M I C に菌株の 90 % 近くが集中している。この点からも T C と C P の間に交差耐性の存在が考えられる。しかし、この交差耐性の程度は一般に平行的なものでなく、一方の薬剤に何倍か耐性になると他方の薬剤に対しても同時に耐性になるといったいわば定性的なものといわれているが、今回の実験成績からはこの点に関して明白な考察はできなかった。

以上の事から、今回の供試菌株についての成績と 1965 年の N E W N H A M と C H U¹⁸⁾ および 1966 年の松井ら^{12,13)} の成績、また本実験における参考菌株 (1 R F および K P - 13) の成績とを比較してみると、S P C T、T C および C P については数倍程度の M I C 値の増加がみられるのみで、特に大きな差異があるとは思われない。しかし、T S および S P M については、ごく最近、国安らもその報告¹¹⁾ で示唆しているように、今回の実験成績からも以前の報告^{2,13,18,21)} に比べて約 1,000 ~ 10,000 倍の耐性化が認められた。同様な事は高橋ら²⁶⁾ によっても指摘されている。

このような T S および S P M に対する M G の耐性化の理由は、わが国における M G 感染症に対し T S および S P M が近年大量に使われてきた事が大きく影響しているものと考えられる。

さらに G R I F F I N⁵⁾ が示唆しているように、最近 M G の薬剤耐性度が高くなっている為、鶏呼吸器性マイコプラズマ病の予防治療に使われている薬物治療をやめるか、同一抗生剤の量を増すか、それとも抗生剤の種類を変えるか、いずれかの方法を検討すべきであろう。

要 約

1969～71年に、わが国各地の成鶏および死ごもり卵から分離された85株の*Mycoplasma gallisepticum* (MG)と参考菌株KP-13, 1RF, SP-23GおよびTS-18Gの4株について、現在鶏のMG感染症の予防治療に用いられている主要抗生剤TC, SPMおよびTSとそれに加えてCPおよびSPCTに対する*in vitro*での最小発育阻止濃度(MIC)を、液体培地希釈法(broth dilution method)により検討した。

その成績は、下記に示すとおりである。

1) TSについては、MICが0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下を示す菌株が11%, また3～30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲を示す菌株が約80%みられた。TSについてのMICの幅は<0.1～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。2) SPMについては、MICが100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示す菌株が62%, 0.3～3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲を示す菌株が28%みられた。そのMICの幅は0.3～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。3) SPCTについては、MIC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す菌株が67%みられ、そのMICの幅は1～30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。4) TCについては、MIC 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す菌株が85%あり、MICの幅は0.3～3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。5) CPについては、MIC 10～30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す菌株が91%あり、MICの幅は3～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。6) 死ごもり卵由来MG株において、孵卵前に卵がTS液に浸漬された卵由来株と、同液非浸漬卵由来株の間には薬剤感受性の差は認められなかった。

以上の成績から、TSとSPMについてのMICは共に分散している事が知られ、それに対して他の薬剤のMICは、ある一定薬剤濃度を中心に比較的集中している事が知られた。

関東と九州というように菌株の分離地域の異なる菌群間で、TSとSPMのMICパターンに差異がみられ、前者は一定薬剤濃度に集中し、後者は広い範囲に分散する傾向がみられ、菌株の薬剤感受性に分離地域による若干の差異がみられた。

供試菌株のCP, TCおよびSPCTに対するMICは、1965年のNEWNHAMとCHU¹⁸⁾および1966年の松井ら^{12,13)}の成績と比較すると、それらのMICは数倍増加していた。さらにTSとSPMについては、最近の数年間に一部の菌株では、約1,000～10,000倍の耐性化が認められた。一方、TCに対する耐性増加は10倍程度であった。

謝 辞

終始技術的協力を頂いた当教室の学生中村博年・河口充宏君に深謝する。

本研究の成績の一部は、第78回日本獣医学会(1974年8月)で口頭発表した。

文 献

- 1) 安藤敬太郎：鶏のマイコプラズマ病に対する生ワクチンの紹介、鶏病研報, **12**, 129-130 (1976)。
- 2) 安藤敬太郎, 藤原 弘：鶏の呼吸器性マイコプラズマ病, pp. 640-661, *In* 農林省家畜衛生試験場技術者集談会(編)：家畜伝染病の診断, 文永堂, 東京(1967)。
- 3) CHALQUEST, R. R. and FABRICANT, J. : Survival of PPLO injected into eggs previously dipped in antibiotic solutions, *Avian Dis.*, **3**, 258-271 (1959)。
- 4) GOREN, E. : Effectiveness of spectinomycin against avian mycoplasma culture cross-resistance with tylosin, *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, **97**, 1185-1188 (1972)。
- 5) GRIFFIN, R. M. : Antibiotic resistance to a strain of *Mycoplasma gallisepticum*, *J. Comp. Pathol.*, **79**, 33-39 (1969)。
- 6) 片江宏己, 中田勝久, 高瀬善行, 清水当尚：動物薬としてのスペクチノマイシンに関する化学療法的研究, 日獣誌, **36**, 341-350 (1974)。

- 7) 近藤房生, 土門春樹, 北野訓敏: 各種抗菌・抗腫瘍剤に対する*Mycoplasma*の試験管内感受性, *Chemotherapy*, **23**, 2569-2576 (1975).
- 8) 小酒井望: 薬剤感受性検査の方法, pp. 521-529, *In* 柳沢謙ほか(編): 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第2版, 日本公衆衛生協会, 東京(1978).
- 9) 国安主税: CRD, pp. 187-211, *In* 堀内貞治, 川村 斉, 関 令二(編): 鶏病図説, 日本畜産振興会, 東京(1968).
- 10) 国安主税, 吉田佳充: *Mycoplasma gallisepticum* 生菌および死菌株接種ひなの生菌再接種に対する態度, 日獣誌, **33** (学会号), 33p. (1971).
- 11) KUNIYASU, C. and YOSHIDA, Y.: Spiramycin- and tylosin-resistant strains of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from breeding chickens and pipped eggs, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **14**, 48-53 (1974).
- 12) 松井光蘭, 安藤敬太郎, 速水稔夫, 大久保輝夫: *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 (1967).
- 13) 松井光蘭, 佐藤静夫, 国安主税: 鶏の呼吸器性マイコプラズマ病, (技術の手引き6), 日本獣医師会, 東京(1967).
- 14) 村田昌芳: 鶏マイコプラズマ症の抗生物質による予防, 治療に関する最近の知見 — 特に*Mycoplasma gallisepticum* 及び大腸菌による, 単独または混合実験感染ヒナを用いた実験成績を中心として —, 家畜の耐性菌研究会報, 第1号, 16-21 (1980).
- 15) 村田昌芳, 三谷克之輔, 川崎博史, 白川 彰, 生田睦治: 初生ヒナにおける実験的 *Mycoplasma gallisepticum* 感染に対するスペクチノマイシン注射の予防効果, 第76回日本獣医学会講演要旨, 114 p., 演題番号183 (1973) [川崎博史: 広島大学水畜産学部卒業論文(1974)].
- 16) 中村昌弘, 尾形 学: 技術編, pp. 153-220, *In* 佐々木正五, 尾形 学, 中村昌弘(編): マイコプラズマ, 講談社サイエンティフィック, 講談社, 東京(1974).
- 17) NEWNHAM, A. G.: Antibiotics in the eradication of avian respiratory mycoplasmosis, *Res. Vet. Sci.*, **4**, 491-505 (1963).
- 18) NEWNHAM, A. G. and CHU, H. P.: An *in vitro* comparison of the effect of some antibacterial, antifungal and antiprotozoal agents on various strains of *Mycoplasma* (P.P.L.O.), *J. Hyg.*, **63**, 1-23 (1965).
- 19) NONOMURA, I. and SATO, S.: Effect of tylosin on chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum* and the Newcastle disease virus B1 strain, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **11**, 100-108 (1971).
- 20) 尾形 学, 跡部ヒサエ: マイコプラズマと抗生物質, モダンメディア, **17**, 299-312 (1971).
- 21) OGATA, M., ATOBE, H., KUSHIDA, H. and YAMAMOTO, K.: *In vitro* sensitivity of *Mycoplasmas* isolated from various animals and sewage to antibiotics and nitrofurans, *J. Antibiotics*, **24**, 443-451 (1971).
- 22) 佐藤静夫: 鶏のマイコプラズマ症, 日獣会誌, **30**, 421-430 (1977).
- 23) SATO, S., MATSUI, K., WATASE, H., ANDO, K., KAWAMURA, H. and TSUBAHARA, H.: Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from chickens affected with chronic respiratory distress in Japan, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **4**, 68-76 (1964).
- 24) 清水当尚, 中村信一, 高瀬善行: 新抗菌剤 piromidic acid の研究. I. 抗菌作用, *Chemotherapy*, **19**, 379-386 (1971).
- 25) 高橋 勇: 抗菌剤の効力試験法, pp. 155-192, *In* 小華和忠, 吐山豊秋, 米村寿男(編): 動物用医薬品・飼料添加物, 新飼料の有用性評価法, フジテクノシステム, 東京(1977).
- 26) 高橋 勇: 鶏由来マイコプラズマの薬剤感受性について, 家畜の耐性菌研究会報, 第1号, 1-5 (1980).

- 27) 武光 哲, 平松計久, 佐々木文存: 鶏の呼吸器性マイコプラズマ病の免疫機序に関する研究. I. 不活性菌接種鶏における感染態度, 日獣誌, **32** (学会号), 259p. (1970).
- 28) 渡辺 力: 化学療法と耐性菌, 朝倉書店, 東京 (1969).
- 29) YAMAMOTO, R. and ADLER, H. E. : The effect of certain antibiotics and chemical agents on pleuropneumonia-like organisms of avian origin, *Am. J. Vet. Res.*, **17**, 538–542 (1956).
- 30) YODER, H. W. Jr. : *Mycoplasma gallisepticum* infection, pp. 236–250, In HOFSTADT, M. S., CALNEK, B. W., HELMBOLDT, C. F., REID, W. M. and YODER, H. W. Jr. (eds.) : Diseases of poultry, 7th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1978).

SUMMARY

A total of 85 strains of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chickens and pipped eggs in various regions in Japan, 1969–71 and some reference strains of *M. gallisepticum* were examined for sensitivity *in vitro* of 5 antibiotics commonly used.

The sensitivity was determined by observation of the minimum inhibitory concentration (MIC : $\mu\text{g/ml}$) *in vitro* of the antibiotics to the cultures by the broth dilution method.

The following results were obtained.

1) No difference of the drug sensitivity was observed between the cultures isolated from pipped eggs with and without tylosin dipping before incubation.

2) The MICs of tylosin to the cultures ranged widely from < 0.1 to $100 \mu\text{g/ml}$. The MICs of $3\text{--}30 \mu\text{g/ml}$ were observed into 80% of the cultures.

3) The MICs of spiramycin to the cultures ranged widely from 0.3 to $100 < \mu\text{g/ml}$. The MICs of $100 < \mu\text{g/ml}$ to 62% and of $0.3\text{--}3 \mu\text{g/ml}$ into 28% of the cultures were observed, respectively.

4) The MICs of spectinomycin to the cultures ranged from 1 to $30 \mu\text{g/ml}$. The MIC of $10 \mu\text{g/ml}$ was observed into 67% of the cultures.

5) The MICs of tetracycline to the cultures ranged from 0.3 to $3 \mu\text{g/ml}$. The MIC of $1 \mu\text{g/ml}$ was observed into 85% of the cultures.

6) The MICs of chloramphenicol ranged from 3 to $100 \mu\text{g/ml}$. The MICs of $10\text{--}30 \mu\text{g/ml}$ were observed into 91% of the cultures.

7) Some localities of the cultures in the drug sensitivity and MIC pattern of the cultures were observed as being based upon the regions which the cultures originated from.

According to the above mentioned results, the increased resistance approximately 1,000 to 10,000 times higher than the results reported by some workers^{12,18)} several years before was confirmed in some cultures examined here to tylosin and spiramycin. However, such a remarkable increasing of resistance of the cultures was not observed to tetracycline.