

實驗用 마우스의 Mycoplasma感染 實態와 分離株의 抗生劑 感受性에 관한 研究

鄭由烈 · 趙誠龍* · 李學喆*

韓國放送通信大學 · 嶺南大學校 農畜產大學*

(1986. 7. 30 接受)

Studies on Mycoplasma Infection of Laboratory Mice and Antibiotic Susceptibility against Isolates

Yoo-yeal Chung · Sung-yong Cho* and Hak-cheul Lee*

Department of Agriculture, Korea Air and Correspondence University.

Department of Animal Science, Yeungnam University*

(Received July 30th, 1986)

Abstract: Isolation and identification of *Mycoplasma* were performed to clarify Mycoplasma infection of mice fed by conventional feeding at two (K₁, K₂) institutes in Korea. The twenty mice to be tested were randomly sampled from each of 10 breeding colonies in respective institute.

Identification of the *Mycoplasma* strains isolated from the nasal cavity, lung and synovia of mice was made according to the morphology of colonies, biological and biochemical properties with special reference to *M. pulmonis*, *M. arthritis* and *M. neurolyticum*. In addition, growth inhibition test was performed using hyperimmune rabbit antisera to the strain PG-22 of *M. pulmonis*, the strain PG-6 of *M. arthritis* and the strain PG-28 of *M. neurolyticum* and also differentiation of isolates from L-form bacteria was done by Dienes staining and culture method with passage of the isolates on liquid media eliminated antibacterial drug.

On the other hand, a total of 13 strains out of the 44 isolated *M. pulmonis* from mice was investigated for their susceptibility against 16 antibiotics *in vitro*. The antibiotic sensitivity test was made using 3×10^4 organisms/0.3ml on each plate(90mm diameter) with antibiotic mono-or tri-disk.

The results obtained are summarized as follows:

1. Out of 20 mice from 10 breeding colonies in K₁ institute, mycoplasma-like strains from the nasal cavity of 16 mice(80%) and from the lung of 8 mice(40%) were isolated, while out of 20 mice in K₂ institute, M-like strains were isolated from the nasal cavity of 14 mice(70%) and from the lung of 6 mice(30%). However, no mycoplasma-like organisms were isolated from the synovia of the 40 mice examined.

All the 44 strains isolated were identified as the organisms of *M. pulmonis*.

2. Out of the 16 antibiotics tested, penicillin, oleandomycin and bacitracin showed no activity against all the 13 *M. pulmonis* strains. On the contrary, lincomycin, clindamycin, chloramphenicol, tetracycline, minocycline, kanamycin, gentamycin and tobramycin showed high activity

with three different antibiotic concentration of tridisk, but amikasin and spiramycin showed intermediate activity. Other antibiotics such as polymyxin B and colistin showed low activity, while erythromycin showed lower activity than others.

緒 論

生命科學 등의 研究를 推進함에 있어서 實驗動物을 使用하는 研究가 不可缺하며, 이때 個體差 異質性 등이 있는 生體를 그대로 取扱하지 않으면 안되는 여러 가지의 制約이 있다.

특히 最近에 와서 生體內에서 이루어지는 複雜한 現象을 分子生物學 水準으로 解明하는 段階까지 發展됨에 따라 免疫, 癌, 老化, 代謝 등의 數 많은 研究分野에 있어서 動物試驗은 加一層 精密化되어야 한다는 것이 要求되고 있다(中川, 1984; 岩井, 1984; Cassell과 Hill, 1979; Lindsey 등, 1978; Saito 등, 1978a). 따라서 實驗動物 그 自體도 遺傳의 性格이 保障되어야 할 뿐만 아니라 微生物學의 으로도 그 質이 保障되어야 한다 (Atobe와 Ogata, 1977; Clärk, 1977; Gleiser, 1977; Jones, 1976; 岩井, 1984; 中川, 1984; 森協, 1984; 田嶋, 1971). 즉 前者는 遺傳, 育種技術의 所産으로 그 目的을 達成할 수 있고 後者는 微生物學의 모니터링 (monitaring) 技術管理로 이루어지는 것이다. 先進國에서는 莫大한 豫算과 高度의 技術을 投入하여 實驗動物에 대한 安定性を 確保하는데 銳意努力하고 있는 現實이다.

오늘날 國內에서 供試되고 있는 實驗動物 중에서 一般적으로 널리 使用되고 있는 마우스를 對象으로 微生物學의 모니터링을 實施할 경우 이들 중에서도 *Mycoplasma* 感染 (McGarrity 등, 1983; Saito, 1982, 1981; Cassell과 Hill, 1979; Saito 등, 1978a, 1978b; Atobe와 Ogata, 1977; Saito 등, 1976; Atobe와 Ogata, 1974; Barden과 Tully, 1969, Ito 등, 1957; Edward와 Freundt, 1956; 中川, 1984; 田嶋, 1971)에 關한 研究를 가장 重要視해야 할 것이다.

그 理由로서 특히 마우스와 같이 動物生産體系가 集團飼育되는 實驗動物에 있어서 *Mycoplasma*에 對한 研究는 specific pathogen free (SPF) 또는 genotobiot 動物을 生産함에 있어서 絶對의 重要하다. 그러나 研究에 應用되는 技法이 매우 복잡하고 어려운 관계로 우리나라에서는 이에 대한 微生物學의 究明이 전혀 이루어져 있지 않을 뿐만 아니라 *Mycoplasma* 感染症에 대한 豫防과 治療 그리고 集團飼育動物의 *Mycoplasma* 淸淨化에 唯一하게 應用될 수 있는 抗生劑 感受성에 關해서도 전혀 究明되어 있지 않다.

따라서 本研究에서는 國內研究機關에서 飼育되는 實驗用마우스를 대상으로 하여 Chanock 등(1962)이 *M. pneumoniae*의 無細胞培地에서의 集落形成에 對하여 報告가 있는 後 最近까지 集積된 研究技法(Razin과 Tully, 1983; Tully와 Razin 1983; Perlman 등, 1967; 輿水와 小谷, 1982; 佐々木, 1980; 小林 등, 1977; 佐々木 등, 1974)을 驅使하여 *Mycoplasma* 分離를 試圖하고, 分離株에 대해서는 生物學, 生化學的, 血清學的 諸性狀을 究明, 同定함과 아울러 感染實態를 調査, 研究하는 한편 分離株에 對하여 各種抗生劑의 感受性 (Furr와 Taylor-Robinson, 1981; Robertson 등, 1981; Barry와 Thornsberry 1980; Ogata 등, 1971; Arai 등, 1966; Bauer 등, 1966; Newnham과 Chu, 1965; 松井와 山田, 1966)을 試驗하여 마우스의 *Mycoplasma* 感染症에 대한 微生物學의 모니터링의 體系確立은 물론 우리나라에서의 *Mycoplasma* 研究의 基盤을 造成코자 한다.

材料 및 方法

1. 供試材料

供試動物: 國內의 2個 研究機關(K₁, K₂)에서 從來方式에 의하여 實驗用으로 飼育된 albino近交系 마우스集團 중에서 各機關의 10個集落(1個集落 約 20마리 內外)으로부터 各各 2마리씩 任意標集한 20마리의 成熟마우스(一部는 약간 未熟했으며 性別은 區別하지 않았음), 즉 總計 40마리를 本試驗에 供試하였다.

培地: *Mycoplasma*의 分離 및 增殖을 위해서는 glucose를 添加한 Chanock(1962)의 液體培地(PPG-broth)와 寒天培地(AM-1 agar)를 여러 研究者들의 報告(輿水와 小谷, 1982; 佐々木, 1980; 小林 등, 1977; 佐々木 등, 1974)에 따라 調製 使用하였다. 즉 液體培地는 PPLO broth w/o crystal violet(Difco) 1.5g를 증류수 70ml에 녹여 121°C, 15分間 高壓滅菌한 後 非加熱한 馬血清 20ml, 25% yeast extract 10ml, 2.5% tallous acetate 1ml, 10萬單位/ml penicillin 1ml, 0.2% phenol red 1ml, 20% glucose 5ml를 각각 無菌의 으로 첨가하였으며 최종 pH는 7.8로 調整했다. 寒天培地는 上記 PPG-broth에 Noble agar(Difco) 1.5g를 添加해서 使用했다.

糖, arginine 및 urea 分解試驗用 培地는 Aluott 등(1970)의 變法에 의한 基礎液體培地에 10%의 glucose,

arginine 그리고 urea를 各各 添加하고, 糖分解試驗의 경우에는 pH 7.6, arginine 또는 urea分解試驗의 경우에는 pH 7.0으로 調整 使用하였다.

Tetrazorium還元試驗을 위해서는 Aluott 등(1970)의 方法에 準하여 固形培地를 使用하였고 *Mycoplasma*株의 保存培地는 Edward의 變法(佐々木 등, 1974)에 準해 SM-1培地를, *Mycoplasma*集落染色을 위해서는 dienes 染色液(輿水와 小谷, 1982; 佐々木 등, 1984)을 使用했다.

發育阻止試驗用 *Mycoplasma*抗血清은 1985年 10月 日本國立豫防衛生研究所에서 分讓받은 PG-52 *M. pulmonis*株, PG-6 *M. arthritis*株, PG-28 *M. neurolyticum*株의 高度免疫家兔血清이었다.

*Mycoplasma*感受性 試驗用 抗生劑는 日本榮研化學株式會社(榮研)製의 tridisk 15種과 昭和化工株式會社(昭和化工)製의 monodisk 1種 計 16種의 抗生劑 disk를 供試하였다. 使用된 tridisk의 種類와 濃度는 penicillin系의 penicillin(0.5, 2, 10U), macrolide系의 erythromycin(0.5, 2, 10 μ g), oleandomycin(2, 5, 15 μ g), clindamycin(1, 5, 15 μ g), chloramphenicol系의 chloramphenicol(5, 10, 30 μ g), tetracycline系의 tetracycline(5, 10, 30 μ g), minocycline(2, 5, 10 μ g), aminoglycoside系의 kanamycin(5, 10, 30 μ g), gentamycin(2, 5, 10 μ g), amikacin(2, 10, 30 μ g), tobramycin(2, 5, 10 μ g), peptide系의 colistin(50, 100, 300U), polymyxin B(50, 100, 300 μ) 등이며, monodisk는 bacitracin(2 μ)이다.

2. 試驗方法

可檢材料의 採取 및 增殖培養: 供試動物의 鼻腔內와 解體한 動物의 肺切斷面 그리고 前肢腕骨部 및 後肢跗骨部의 關節切斷面에 broth를 묻힌 滅菌綿棒을 挿入하여 綿棒中間部를 切斷해서 下端部만을 PPG-broth와 PPA-broth에 各各 沈下시켜 37°C, 4~5日間 培養하였다.

分離培養 및 集落의 觀察: 上記培養에서 *Mycoplasma* 增殖은 培地에 添加된 指示藥인 phenol red의 變化로 判斷하였으며 分離培養은 그 培養材料 0.1ml을 50mm petri-dish PPG-agar面에 滴下, 全面에 均等하게 擴散시켜 비닐주머니속에 吸濕脫脂綿과 함께 넣어서 封한 後(以後 固形培地를 使用한 好氣의 培養은 이 方法에 準하였음), 37°C, 4~7日間 培養하여 *Mycoplasma* 集落을 形成시켰으며 形成된 微細集落은 實體顯微鏡(倍率 20~100X)下에서 *Mycoplasma* 特異의 集落形態를 細密히 觀察하였다.

濾過試驗 및 Cloning: 分離微生物이 新種인 것을 提

案할 時에 必須의인 試驗이나(輿水와 小谷, 1982) 본 試驗에서는 *Mycoplasma*라는 것을 確認하는 一環으로 上記 PPG-agar面에 形成된 單一集落을 液體培地에 移植, 37°C에서 4~5日間 培養한 後 培養液을 450nm의 millipore micro-syringe filter로 濾過하여 濾過液 0.1ml를 固形培地에 培養하였으며 *Mycoplasma* 特異集落의 形成有無에 의해 濾過與否를 判斷하였으며, *Mycoplasma* 集落으로 認定되는 單一集落寒天 block를 切取 所謂 "push block technique"法으로 固形培地上에 2代에 걸쳐서 clone化하였다.

L型과의 鑑別: dienes染色法의 變法(小林 등, 1977)에 의하여 cloning한 集落을 染色, 實體顯微鏡(40~100X)下에서 靑色을 나타내는 明瞭한 集落일 때 *Mycoplasma* 集落으로, 그렇지 않을 때 L型集落으로 判斷하였으며, L型菌으로의 復歸與否를 檢査하기 위하여 上記 clone化한 單一集落寒天 block切片을 除抗菌劑 液體培地에서 2代繼代한 後 除抗菌劑 固形培地에 塗布培養한 後 *Mycoplasma* 特異集落形態의 變化가 없을 때 *Mycoplasma*로 認定하였다.

生化學的 性狀檢査: sterol要求性 試驗은 digitonin感受性 試驗法을 採擇하였다(佐々木 등, 1974; Razin과 Tully, 1983). 즉 分離株를 接種한 固形培地에 1.5% digitonin 溶液 0.02ml가 含有된 直徑 6.35mm 濾紙(disk)를 얹어 37°C, 4~5日間 培養하여 disk周邊의 發育阻止帶 有無에 따라 sterol要求性を 判定하였다. 糖, arginine, 尿素分解試驗은 Aluotto 등(1970)의 基礎培地에 glucose, mannitol 등 2種의 糖과 arginine, 尿素를 各各 10% 添加한 試驗用培地에 10% 馬血清이 添加된 heart infusion broth(Difco)에서 24시간 培養한 被檢菌을 各 1ml씩 接種하여 37°C 1~3日間 매일 觀察하면서 培地의 色調變化에 따라 判定하였다. tetrazorium還元試驗은 Aluotto 등(1970)의 方法에 따라 集落寒天 block를 push block technique로 2枚의 試驗用 培地에 各各 接種하여 비닐주머니를 使用한 好氣培養과 BBL gaspak anaerobic system(5% CO₂+95% N₂ gas)으로 各各 培養, 2週間을 觀察하면서 試驗培地가 赤變하면 陽性으로 判定하였다.

發育阻止試驗: Clyde(1974)의 disk法을 準用했다. 즉 Smith(1956)의 方法으로 細胞數를 計測, 10⁶CFU/ml가 含有되도록 液體培地로 稀釋한 細胞液 0.1ml를 固形培地平板(直徑 50mm petridish)에 接種하여 滅菌 곤라지棒으로 均等擴散시켜 靜置해둔 後, 日本國立豫防衛生研究所에서 分讓받은 上記供試抗血清과 對照用의 正常家兔血清 0.025ml가 各各 吸收된 直徑 7mm disk를 上記 試驗用培地에 얹어서 好氣의 37°C에

서 3~5日間 培養하여 disk周邊에 2mm以上の 發育阻止帶가 形成되는 것을 陽性으로 判斷하였다.

抗生劑感受性試驗 : Bauer-kirby disk-zone法(Bauer 등, 1966)의 變法에 準하였다. 10⁸CFU/ml를 含有한 液體培養材料 0.3ml(3×10⁴CFU)를 固形培地平板(直徑 90mm petridish)에 接種, 培地全面에 均等히 擴散시켜 둔 후 上記 日本榮研製 tridisk와 昭和化工製 monodisk를 培地全面에 設어서 好氣的으로 37°C 3~5일간 培養하였다. 그 結果 榮研製 tridisk의 경우 抗生劑의 低濃度, 中濃度, 高濃度の 3가지 濃度에 있어서 disk의 對角線상의 邊緣 3mm以內의 阻止帶를 強度(+), 3~8mm의 것을 中等度(++) , 8mm 以上の 것을 強度(+++)로 表示하고, 會社가 指示한대로 上記 3가지 濃度에 있어 모두 (+)以上の 阻止帶가 形成된 것은 強度感受性(++), 中濃度和 高濃度の 두가지에만 形成된 것은 中等度感受性(++), 低濃도에서만 形成된 것은 弱度感受性(比較的 抵抗力, +) 그리고 어느 濃度에서도 阻止帶가 形成되지 않는 것은 抵抗力(-)으로 判定하였다. 한편 昭和化工의 monodisk의 경우는 disk邊緣 0.5~1.5mm의 阻止帶가 形成된 것은 弱度感受性(+), 2~4.5mm인 것은 中等度感受性, 5~11mm인 것은 強度感受性으로 判定하였고, 阻止帶가 形成되지 않은 것은 抵抗力(-)으로 認定하였다.

結 果

Mycoplasma 分離 및 同定試驗 : 國內 2個機關(K₁, K₂)에서 實驗用으로 飼育되는 albino近交系 마우스 各 20마리, 總 40마리에 대해서 *Mycoplasma*分離와 同定試驗을 實施한 成績은 Table 1과 같다.

먼저 K₁機關에 대한 分離成績을 보면 供試된 20마리 중 16마리(80%)의 鼻腔으로부터 *M. pulmonis*를 分離, 同定하였으나 殘餘 4마리(20%)중 2마리에서는 *Mycoplasma*를 分離하지 못하였고, 2마리에도 固形培地上에 形成된 集落의 形態가 上記 16마리로부터 分離된 것보다 크기가 倭小하였을 뿐만 아니라 集落中央部에 形成되는 *Mycoplasma*集落 特有的 乳頭(nipple)같은 것이 전혀 觀察되지 않는 등 集落의 cloning作業이 如意치 않았다.

上記 供試動物의 肺로부터 分離, 同定한 結果를 보면 供試한 20마리 중 8마리(40%)에서 *M. pulmonis*가 分離, 同定되었으나 殘餘 12마리(60%)로부터는 *Mycoplasma*가 分離되지 않았다.

한편 K₂機關에 대한 分離成績을 보면 供試된 20마리 중 14마리(70%)의 鼻腔에서, 6마리(30%)의 肺에서 *M. pulmonis*가 各々 分離, 同定되었으며, 兩機關 모두

肺에서 *Mycoplasma*가 分離된 個體는 모두 鼻腔에서 分離되었으며 鼻腔에서 分離되지 않은 個體에서는 肺에서도 전혀 *Mycoplasma*가 分離되지 않았다.

以上과 같이 80個의 可檢材料로 부터 分離된 44株의 *M. pulmonis*의 集落形態는 實體顯微鏡(40~100X)下에서, 微小, 圓形, 滑澤하고 比較的 透明하게 보였으나 集落表面에 微細한 顆立이 散布되어 있는 것처럼 보이며 集落中央部에 *Mycoplasma*集落의 典型的인 乳頭를 갖는 所謂 "nipple-like colony"를 나타낸 것이 많았으나 一部集落에서는 特徴적인 乳頭가 形成되지 않는 것도 觀察되었다.

이들 分離 *Mycoplasma*集落은 dienes染色에 의하여 L型細菌集落과 明白하게 區別이 되는 한편 除抗菌劑 液體培地를 使用한 3代繼代培養을 통해서도 L型菌으로 復歸되지 않았다. 液體培地材料를 使用한 450mm 濾過試驗에서 모두 濾過됨을 認定하였다. 그리고 sterol을 要求하지 않는 *Acholeplasma*와 區別하기 위한 digitonin 感受性試驗에서는 直徑 5~10mm의 阻止帶가 形成되었으며, glucose, mannitol 등 糖分解는 모두 陽性이고, arginine加水分解試驗과 *Ureaplasma*와 區別하기 위한 尿素分解試驗 그리고 tetrazorium還元試驗은 모두 陰性이었다. 最終적으로 分離株를 同定하는 抗血清과의 發育阻止試驗에서 PG-22 *Mycoplasma pulmonis*株의 高度免疫家兔血清에서만 直徑 3~5mm의 發育阻止帶가 形成되었고 *M. arthritis*, *M. neurolyticum*의 抗血清 및 家兔正常血清에서는 阻止帶가 形成되지 않았다.

抗生劑感受性試驗 : *M. pulmonis*로 同定된 44株中 任意로 13株를 選擇하여 榮研의 tridisk 15種과 昭和化工의 monodisk 1種 計 16種의 抗生劑에 對한 感受性試驗을 實施한 成績은 Table 2에 表示한 바와 같이 penicillin系의 penicillin, macrolide系의 oleandomycin, peptide系의 bacitracin은 供試株 모두에 대해 各々 抵抗力을 나타냈으며 lincomycin系의 lincomycin, oleandomycin, chloramphenicol系의 chloramphenicol, tetracyclin系의 tetracyclin, minocyclin, aminoglycoside系의 kanamycin, gentamycin, tobramycin은 供試株 모두에 對해서 各々 強度感受性を 나타냈다.

한편, macrolide系의 erythromycin은 供試 13株中 4株에 對해서만 弱度感受性이고 殘餘 9株에 대해서는 모두 抵抗力이었다. spiramycin은 12株에는 모두 中等度感受性を, 殘餘 1株에 대해서는 弱度感受性を 나타내었다. 그리고 aminoglycoside의 amikacin은 9株에 대해서 強度感受性を, 나머지 4株에 대해서는 中等度感受性を 나타냈으며 peptide系의 colistin은 8株에 대해

Table 1. Biological and Biochemical Characteristics of *Mycoplasma* Isolated from Nasal Cavity and Lung of Mice

Name of institutes	K1		K2	
	20		20	
No. of mice tested				
Isolated site	Nasal Cavity	Lung	Nasal Cavity	Lung
No. of isolates	16	8	14	6
Ratio of isolates	80%	40%	70%	30%
Isolation culture on PPG broth ^a	CCY ^b	CCY	CCY	CCY
Millipore-Membrane filtration	+ ^c	+	+	+
Cloning on PPG agar 1st	MLC ^d	MLC	MLC	MLC
2nd	MLC	MLC	MLC	MLC
3rd	MLC	MLC	MLC	MLC
Dienes staining	+ ^e	+	+	+
Differentiation from				
L-from bacteria	NL ^f	NL	NL	NL
Requirement of sterol:				
Digitonin-test	+ (10) ^g	+ (10)	+ (10)	+ (10)
Biochemical properties:				
Glucose	+ ^h	+	+	+
Arginin	- ⁱ	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-
Reduction of tetrazorium:				
Aerobic	- ^j	-	-	-
Anaerobic	- ^k	-	-	-
Growth inhibition	+ (5) ^l	+ (5)	+ (5)	+ (5)
Results	Mp ^m	Mp	Mp	Mp

Remarks: a; Chanock's liquid media added glucose, b; Changed color of media with yellow, c; Filtrated and propagated on media, d; Produced *Mycoplasma* like colony, e; Indicates *Mycoplasma* colony, f; Not L-form bacteria, g; Require sterol and number in paranthesis indicates diameter(mm) of inhibitory zone for *Mycoplasma* growth, h; Positive fermentation of glucose or mannitol, i; Negative fermentation of arginine or urea, j; Negative reaction in aerobic culture, k; Positive reaction in anaerobic culture, l; Growth inhibition of *Mycoplasma* by use of antiserum of *M. pulmonis* and number in paranthesis indicates diameter(mm) of inhibitory zone of *Mycoplasma* growth, m; Identified as *M. pulmonis*.

서 弱度感受性を, 나머지 5株에서는 抵抗性を 나타냈다. 그리고 polymyxin B는 供試全株에 대하여 모두 弱度感受性を 나타내었다.

考 察

最近人間, 動·植物 및 昆虫에 이르는 生物과의 關聯에 있어서는 *Mycoplasma*는 물론 *Acholeplasma*, *Ureaplasma* 및 *Spiroplasma*에 關한 研究는 그 重要性이 加重되고 있다(Balduzzi와 Charbonneau, 1964; Buskrik, 1967; Cross 등, 1967; Perlman 등, 1967; Pollock 등, 1963; Rahman 등, 1967; 輿水와 小谷, 1982; 佐々木, 1980; 佐々木 등, 1974).

따라서 本研究는 우리나라에 있어서 實驗動物로 가

장 널리 使用되는 마우스에 대한 微生物學的의 모니터링 특히 *Mycoplasma*分離와 同定의 技術의 體系를 確立하고, *Mycoplasma*感染의 實態와 分離株에 대한 抗生劑感受性(Atobe와 Ogata, 1974; Domermuth, 1960; Ogata 등, 1971; 佐々木, 1980)을 밝혔다는 것은 미래에 있어서 우리나라 實驗動物에 대한 管理技術體系를 確立해 나감에 있어 매우 意義가 크다고 본다.

國內 2個機關에서 研究用으로 飼育되는 마우스集團에서 各各 20마리씩 任意抽出한 動物의 鼻腔, 肺, 關節로부터 *Mycoplasma*를 分離하였던 마 鼻腔으로부터 각각 80%, 70%, 肺로부터 40%, 30% 그리고 關節로부터는 전혀 分離되지 않았으며(0%) 總 44株의 *M. pulmonis*가 分離되었고 그밖에 마우스와 關聯되는 *M.*

Table 2. Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma pulmonis* Strains Isolated from Laboratory Mice

Antibiotics	Strain No.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Penicillins;													
Penicillin	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrolides;													
Erythromycin	-	+ ^b	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Oleandomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spiramycin	+	++ ^c	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Lincomycins;													
Lincomycin	+++ ^d	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cilindamycin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Chloramphenicols;													
Chloramphenicol	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tetracyclins;													
Tetracycline	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Minocycline	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Aminoglycosides;													
Kanamycin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Gentamycin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Amikasin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tobramycin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Peptides;													
Colistin	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Polymyxin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacitracin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Remarks: a; Resistance on antibiotic susceptibility,
b, c, d; Low, intermediate and high susceptibility of antibiotics, respectively.

arthritis, *M. neurolyticum*, *M. muris* 등은 1例도 分離되지 않았다.

이와 같은 分離趨勢는 Cassell(1983), Cassell과 Hill (1979), Lindsey 등(1978)의 報告와 전적으로 일치하나 日本에서의 마우스集落에 대한 *M. neurolyticum*의 分離狀況檢査에서 약 50%의 汚染이 있었다는 從前報告(佐々木, 1980)와 判異하므로 今後 더욱 追求, 檢討되어야 할 課題가 아닌가 본다. *M. arthritis*에 關하여는 마우스의 結膜炎 發生報告가 있으나 最近 10餘年間 전혀 自然發生의 報告(Cassell 등, 1983)가 없는 것과 本研究에서의 成績이 일치된다. *M. muris*에 關하여는 McGarrity 등(1983)이 最近에 마우스로부터 分離, 報告하였는데 本研究에서는 分離되지 않았다. 이는 分離對象部位의 差異, 즉 그들은 尿生殖, 結膜, 咽喉頭 등이었는데 本研究에서는 鼻腔, 肺, 關節로부터의 分離였다는 것에 起因되는 것인지 또는 이의 分離頻도가 극히 낮은 것에 起因되는 것인지는 앞으로 關聯要因에

對해서 追求해야 할 것으로 본다.

다음으로 *M. pulmonis* 分離率에 關하여 Saito 등(1976)의 成績과 比較考察해 보면 이들은 接觸感染 7日 및 6週後에 다같이 鼻腔, 氣管, 口腔에서 各各 100%, 中耳, 腦에서 95%, 肺에서 25%, 臍, 子宮에서 20% 였는데, 本試驗에서는 鼻腔에서 平均 75%, 肺에서 平均 35%, 關節로 부터 0%로 鼻腔이 多少낮고, 肺는 多少높은 成績이었으나 分離頻度の 傾向은 大體로 같다고 보여진다.

다음으로 本研究에서 얻은 抗生物質 感受性試驗成績에 對해서 考察하면 다음과 같다.

*Mycoplasma*를 비롯한 *Acholeplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma*(Liao와 Chen, 1981)에 대한 藥劑感受성에 關하여는 그동안 많은 研究者들에 의해서 追求되었으며 Newnham과 Chu(1965)는 1948年이후 이방년의 報告를 總括하여 *Mycoplasma*와 藥劑感受性과의 關係를 밝힌 바 있으며 最近의 報告에 있어서도 人間由來 *M.*

pneumoniae(Furr와 Taylor-Robinson, 1981; Senterfit, 1981; Niitu 등, 1974a, 1974b; Niitu 등, 1970; Braun 등, 1970; Stewart 등, 1969; Jao와 Finland, 1967; Arai 등, 1966)와 *Ureaplasma*(Taylor-Robinson과 Furr, 1982; Robertson 등, 1981; Kishima와 Hashimoto, 1979; Smith, 1979; Braun 등, 1970)에 관한 것이 많다. 動物由來 *Mycoplasma*의 感受性에 관한 報告는 鳥類에 對한 것이 比較의 많고(Domermuth, 1958; Newnham, 1963) 一部 豚由來에 對한 것도 있다(Williams, 1978). 各動物由來 呼吸器系 *Mycoplasma*과 *Acholeplasma*에 대한 각종 抗生劑의 感受性에 關하여 Ogata 등(1971)이 詳細히 報告하였는데 이들이 MIC(minimum inhibition concentration)法에 의해서 *M. pulmonis*를 對象으로 얻은 成績과 本研究의 試驗成績을 比較, 考察하면 다음과 같다. 즉 Ogata 등(1971)이 tetracycline系의 tetracycline, chlortetracycline, methacycline에 對해서 抗生劑感受性を 실시하여 모두 弱度感受性(+)을 나타냈으나 本研究에서는 chlortetracycline, methacycline은 사용하지 않았으며, 使用한 tetracycline, minocycline에 대해서 모두 強度感受性(卍)을 나타냈다. Macrolide系에서 Ogata 등(1971)의 tylosin에 限해서 強度感受性(卍)을, erythromycin, oleandomycin이 抵抗性(-)을, spiramycin은 弱度感受性(+)을 나타낸다고 하였는데 本試驗에서는 tylosin 및 leucomycin에 대해서는 試驗하지 않았으며 erythromycin은 주로 抵抗性(-) 또는 一部株에서 弱度感受性(+)을, oleandomycin에는 抵抗性(-)을, spiramycin에는 주로 中等度感受性(卐) 또는 一部株에서 弱度感受性を 나타냈으며 大體로 이들의 成績과 같은 傾向이었다.

Peptide系 抗生劑인 colistin, polymyxin B의 抵抗性(-), 또한 bacitracin의 抵抗性(-)인 것도 Ogata 등(1971)의 成績과 同一하였다. Aminoglycoside系의 抗生劑實驗에서는 Ogata 등(1971)의 成績은 kanamycin이 弱度感受性(+)이었는데 本試驗에서는 이것 외에 使用된 gentamycin, amikasin, tobramycin 다같이 強度感受性(卍)을 나타내었으며, chloramphenicol系에서 이들의 成績은 chloramphenicol이 弱度感受性(+)을 나타냈으나 本試驗에서는 強度感受性(卍)을 나타냈다. Lincomycin系의 抗生劑感受性試驗에서 Ogata 등(1971)의 成績은 lincomycin, 弱度感受性(+)이었으나 本試驗에서는 lincomycin, cliandamycin 모두 強度感受性(卍)이었다.

이상과 같이 本試驗의 成績을 Ogata 등(1971)이 報告한 成績과 比較考察할 때 使用한 여러가지 抗生劑中 一部는 一致했으나 一部는 感受性의 程度에 있어서 強

하게 나타났으며 強度感受性を 갖는 抗生劑는 Ogata 등(1971)이 報告한 것 이외에도 여러 종류가 있다는 것을 밝힌 것은 意義가 큰 것으로 본다. 그리고 penicillin에 對해서 抵抗性인 것은 Ogata 등(1971) 그리고 先人들의 報告와 本試驗에서의 成績이 일치하고 있음을 認定되었다.

上記와 같은 兩者間의 比較에 있어 한가지 考慮해야 할 點은 Ogata 등(1971)은 MIC法에 의한 成績이고 本試驗은 disk法에 의한 成績이며 Senterfit(1983)는 MIC法試驗에 있어 10^4 CFU/0.2ml 含有細胞液 0.175ml를 0.025ml의 抗生劑含有培養液에 接種하는 것을 勸奨하고 있다. 本試驗에서는 3×10^4 CFU/0.3ml 含有細胞를 直徑: 90mm petridish 寒天全面에 塗布, 接種하여 disk에 含有된 抗生劑의 效果를 보았으며 이들 兩者間에 있어 接種細胞數의 不足으로 因한 抗生劑의 過大評價, 反對로 過多細胞數로 因한 抗生劑의 過小評價라는 問題가 있으므로 方法이 다른 兩者의 成績을 比較評價한다는 것은 多少 無理한 點이 있지 않는가 본다. 그러나 이들 兩者間의 使用細胞數를 堪案할 때 兩者의 成績은 어느정도 併行하는 것으로 看做하나 同一 *Mycoplasma*株를 對象으로 한 相互比較試驗을 通하여 檢討되어야 할 것이다.

結 論

慶北地方의 2個(K₁, K₂)研究機關에서 飼育되는 實驗用마우스集團 중에서 10個集落을 選定, 各集落으로부터 2마리씩 任意標本抽出한 計 40마리를 對象으로 鼻腔, 肺, 關節에서 *Mycoplasma*分離를 試圖하였다.

分離株에 對해서는 生物學的, 生化學的, 血清學的의 諸性狀을 究明하여 同定함과 同時 感染實態를 把握하고 各種抗生劑에 대한 感受性試驗을 實施하였다.

本試驗의 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. *Mycoplasma*는 K₁機關에서 供試된 20마리 중 16마리(80%)의 鼻腔과 8마리(40%)의 肺로부터 各各 分離되었으며, K₂機關에서 供試된 20마리 중 14마리(70%)의 鼻腔과 6마리(30%)의 肺로부터 各各 分離되었다. 그리고 上記 44個의 分離株는 모두 *M. pulmonis*로 同定되었으며 關節로부터는 어느供試動物에서도 전혀 *Mycoplasma*가 分離되지 않았다.

2. 供試한 分離 *M. pulmonis* 13株는 penicillin系의 penicillin, macrolide系의 oleandomycin, peptide系의 bacitracin에 대해서 모두 抵抗性を 나타냈으나, lincomycin系의 lincomycin, clindamycin, chloramphenicol系의 chloramphenicol, tetracycline系의 tetracycline, minocycline, aminoglycoside系의 kanamycin,

gentamycin, tobramycin, amikacin(4株만이 中等度感受性)에 대해서 모두 強度感受性を 나타내었다. 그리고 macrolide系의 spiramycin(1株만이 弱度感受性), erythromycin(4株만이 弱度感受性)에 대해서는 대체로 抵抗性を 나타냈으며, peptide系의 polymyxin B, colistin(5株는 抵抗性)은 弱度感受性を 나타내었다.

参 考 文 献

- Aluotto, B.B., Wittler, R.G., Williams, C.O. and Faber, J.E. (1970) Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. J. Syst. Bacteriol, 20:35~38.
- Arai, S., Yoshida, K., Lzawa, A., Kumagai, K. and Ishida, N. (1969) Effect of antibiotics on growth of *Mycoplasma pneumoniae*. Mac. J. Antibiotics, Ser., A19:118~120.
- Atobe, H. and Ogata, M. (1977) Protective effect of killed *Mycoplasma pulmonis* vaccine against experimental infection in mice. Jap. J. Vet. Sci., 39:39~46.
- Atobe, H. and Ogata, M. (1974) Pneumonitis in mice inoculated with *Mycoplasma pulmonis*: Production of pulmonary lesions and persistence of organisms and antibiotics. Jap. J. Vet. Sci., 36:493~503.
- Balduzzi, P. and Charbonneau, R.J. (1964) Decontamination of PPLO infected tissue cultures. Experientia, 20:651~652.
- Barden, J.A. and Tully, J.G. (1969) Experimental arthritis with *Mycoplasma pulmonis*. J. Bacterio., 100:5~10.
- Barry, A.L. and Thornsberry, C. (1980) Susceptibility testing: Diffusion test procedures. In "Manual of Clinical Microbiology" (E.H. Lennette, A. Palows, W.J. Hausler, Jr., and P. Tenet, eds), 3rd ed. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp. 463~474.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turk, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493~496.
- Braun, P., Klein, J.O. and Kass, E.H. (1970) Susceptibility of genital mycoplasmas to antimicrobial agents. Appl. Microbiol., 19:62~70.
- Buskrik, H.H. (1967) Control of pleuropneumonia-like organisms in cell culture. Appl. Microbiol., 15:1442.
- Cassell, G.H. and Hill, A. (1979) Murine and other small animal mycoplasma. In "The Mycoplasma" (J.G. Tully and R.F. Whitcomb, eds). Vol. 2, Academic Press, New-York. pp.235~273.
- Cassell, G.H., Davidson, M.K., Davis, J.K. and Lindsey, J.R. (1983) Recovery and Identification of Murine Mycoplasma, In "Method in Mycoplasmaology," Vol. II. Diagnostic Mycoplasmaology," (J.G. Tully and S. Razin eds), Academic Press, New-York, pp.129~142.
- Clark, J.D. (1977) Epidemiology, In "Handbook of Laboratory Animal Science" (E.C. Melby, Jr. and N.H. Altman, eds). Vol.1, CRC Press Inc., Ohio. pp.213~230.
- Clyde, W.A. Jr. (1974) Mycoplasma species. Identification based upon growth inhibition by specific antisera. J. Immunol., 92:958~965.
- Cross, G.F., Goodman, M.R. and Shaw, E.J. (1967) Detection and treatment of contaminating mycoplasmas in human cell culture. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 45:201~202.
- Dienes, L. (1939) "L" organism of Klieneberger and streptobacillus moniliformis. J. Infect. Dis. 65:24~32.
- Demermuth, C.H. (1960) Antibiotic resistance and mutation rates of mycoplasma. Avian Dis., 4: 456~566.
- Domermuth, C.H. (1958) *In vitro* resistance of avian pleuropneumonia-like organism to antibacterial agents. Avian Dis., 2:442~449.
- Edward, D.G. ff. and Freundt, E.A. (1956) The classification and nomenclature of organism of the pleuropneumonia group. J. Gen. Microbiol., 14:197~207.
- Furr, P.M. and Taylor-Robinson, D. (1981) The inhibitory effect of various antiseptics, analgesics and lubricants on mycoplasmas. J. antimicrob. Chemother., 8:115~119.
- Gleiser, C. (1977) Diseases of Laboratory Animals-Bacterial, In "Handbook of Laboratory Animal Science" (E.C. Melby, Jr. and N.H. Altman, eds), Vol.2, CRC Press Inc., Ohio, pp.273~278.

- Ito, s., Imaizumi, K., Tajima, Y., Eudo, M. and Koyama, R. (1957) A disease of rats caused by a pleuropneumonia-like organism (PPLO) Jpn. J. Exp. Med., 27:243~247.
- Jao, R.L. and Finland, M. (1967) Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to 21 antibiotics *in vitro*. AM. J. Med. Sci., 253:639~650.
- Jones, S.R. (1976) Naturally occurring Neoplastic Disease- I. Mouse, In "Handbook of Laboratory Animal Science" (E.C. Melby, Jr. and N.H. Altman, eds), Vol. 3, CRC Press Inc., Ohio. pp. 221~225.
- Kishima, M. and Hashimoto, K. (1979) *In vitro* sensitivities to antimicrobial drugs of ureaplasmas isolated from the bovine respiratory tract, genital tract and eye. Res. Vet. Sci. 27, 218~222.
- Liao, C.H. and Chen, T.A. (1981) *In vitro* susceptibility and resistance to two spiroplasmas to antibiotics. Phytopathology, 71:442~445.
- Lindsey, J.R., Cassel, G.H. and Baker, H.J. (1978) Disease due to mycoplasmas and rickettsias. In "Pathology of Laboratory Animals" (K. Biniarsche, F. Garner and C. Jones, eds.), Vol. 2, New York, pp. 1482~1150.
- McGarrity, G.J., Rose, D.L., Phillips, D.M. and Tully, J.G. (1983) *Mycoplasma muris*, a new species from laboratory mice. Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 129.
- Newnham, A.G. and Chu, H.P. (1965) An *in vitro* comparison of the effects of some antibacterial, antifungal and antiprotozoal agents on various strains of mycoplasma (PPLO). J. Hyg. Camb., 63:1~23.
- Newnham, A.G. (1963) Antibiotics in the eradication of avian respiratory mycoplasmosis. A review the literature together with the results of laboratory trials using chlortetracycline and dimethylchlortetracycline. Res. Vet. Sci., 4: 491~505.
- Niitu, Y., Hasegawa, S. and Kubota, H. (1974) Usefulness of an erythromycin-resistant strain of *Mycoplasma pneumoniae* for the fermentation-inhibition test. Antimicrob. Agents Chemother., 5:111~113.
- Niitu, Y., Kubota, H., Hasegawa, S., Horikawa, M. and Suetake, T. (1974) Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to antibiotics *in vitro*. Jpn. J. Microbiol., 18:149~155.
- Niitu, Y., Hasegawa, S., Suetake, T., Kubota, H., Komatsu, S. and Horikawa, M. (1970) Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to erythromycin and other antibiotics. J. Pediatr., 76:438~443.
- Ogata, M., Atobe, H. and Yamamoto, K. (1971) *In vitro* sensitivity of mycoplasmas isolated from various animals and sewage to antibiotics and nitrofurans. J. Antibiotics, Ser., A24:443~451.
- Perlman, D., Rahman, S.B. and Semar, J.B. (1967) Antibiotic control of mycoplasma in tissue culture. Appl. Microbiol., 15:82~85.
- Pollock, M.E. and Treadwell, P.E. and Kenny, G.E. (1963) Mammalian cell cultures contaminated with Pleuropneumonia-like organism. II. Effect of pleuropneumonia-like organism on cell morphology in established monolayer cultures. Exp. Cell Res., 31:321~328.
- Razin, S. and Tully, J.G. (1983) Method in Mycoplasmaology, Vol. I, Mycoplasma Characterization, Academic press, New York. pp. 1~497.
- Rahman, S.B., Semar, J.B. and Perlman, D. (1967) Antibiotic resistance in mycoplasma isolates from (contaminated) tissue cultures. Appl. Microbiol., 15:970.
- Robertson, J.A., Coppola, J.E. and Heislar, O.R. (1981) Standardized method for determining antimicrobial susceptibility of strains of Ureaplasma urealyticum and their response to tetracycline, erythromycin and rosaramicin. Antimicrob. Agents Chemother., 20:53~58.
- Saito, M., Makayama, K., Muto, T. and Nakagawa, M. (1982) Effect of Gaseous Ammonia on *Mycoplasma pulmonis* Infection in Mice and Rats, Exp. Anim., 31(3):203~206.
- Saito, M., Nakagawa, M., Kinoshita, K. and Imaizumi, K. (1981) Synergistic Effect of Sendai Virus on *Mycoplasma pulmonis* Infections in Mice. Jpn. J. Vet. Sci., 43:43-50.

- Saito, M., Nakagawa, M. and Kinoshita, K. (1978a) Etiological Studies on Natural Outbreaks of Pneumonia in Mice, Jap. J. Vet. Sci., 40: 283~290.
- Saito, M., Nakagawa, M. and Muto, T. (1978b) Strain Difference of Mouse in Susceptibility to *Mycoplasma pulmonis* Infection, Jap. J. Vet. Sci., 40:697~705.
- Saito, M., Nakayama, K. and Nakagawa, M. (1976) Localization of Mycoplasma in Mice, Exp. Anim., 25(4):265~272.
- Senterfit, L.B. (1983) Antibiotic sensitivity of Mycoplasmas. In "Method in Mycoplasmaology" Vol. 2-Diagnostic Mycoplasmaology" (J.C. Tully and S. Razin eds), Academic Press, New-York, pp.397~401.
- Senterfit, L.B. (1981) Comparative *in vitro* sensitivity of *Mycoplasma Pneumoniae* to rosamycin, erythromycin, tetracycline and spectinomycin drugs. Exp. Clin. Res., 7:317~319.
- Smith, T.F. (1979) *In vitro* susceptibility of Ureaplasma urealyticum to rosamycin. Antimicrob. Agents Chemother., 16:106~108.
- Smith, P.F. (1956) Quantative measurement of the growth of pleuropneumonia-like organisms. Appl. Microbiol., 4:254.
- Stewart, S.M., Burnet, M.E. and Young, J.E. (1969) *In vitro* sensitivity of strains of mycoplasmas from man sources to antibiotics and sodium aurothromalate and tylosin tartrate. J. Med. Microbiol., 2:287~292.
- Taylor-Robinson, D. and Furr, P. (1982) The static effect of rosaramicin on Ureaplasma urealyticum and the development of antibiotic resistance. J. Antimicrob. Chemother., 10:185~192.
- Tully, J.G. and Razin, S. (1983) Methods in Mycoplasmaology, Vol. II, Diagnostic Mycoplasmaology, Academic press, New York. pp.1~440.
- Williams, P.P. (1978) *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* to fifty-one antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother., 14:210~213.
- 岩井 法(1984) ウイルス感染の モニタリング, 実験動物 シンポジウム—実験動物等の 開発研究の 現状と 問題点(科学技術廳, 文部省, 理化学財團, ライフサイエンス振興財團), pp.6~8.
- 小林園子, 帖佐浩, 本間遜(1977) マイコプラズマの 分離と 同定, 臨床検査, 21:7~16.
- 松井光蘭, 山田獻一(1966) *Mycoplasma gallisepticum* の 抗生物質に 對する試験管内耐性獲得試験, 日獣學誌, 28:480.
- 森 協和郎(1984) マウスの 遺傳學的 モニタリング, 實驗動物 シンポジウム— 實驗動物等の開發研究の 現状と 問題点(科学技術廳, 文部省, 理化学財團 ライフサイエンス 振興財團), pp.10~12.
- 中川雅郎(1984) 細菌感染症のモニタリング, Ibid., pp. 2~4.
- 與水馨, 小谷均(1982) 動物マイコプラズマの分離と 同定, "ヒト. 動物おとび植物 マイコプラズマの 分離と 同定, 第1版, 日本細菌學會教育委員編, 榮根出版, 東京, pp.41~86.
- 佐々木 正五編(1980) マイコプラズマ圖説, 第1刷, 東海大學出版社, 東京, pp.17~51.
- 佐々木 正五, 尾形學, 中村昌弘編(1974) マイコプラズマ, 第3刷, 講談社サイエンティフィック, 東京, pp.153~220.
- 田嶋嘉雄(1971) 實驗動物, "獸醫微生物學", 平戶勝七編, 第5版, 養賢堂, 東京, pp.202~221.