

牛マイコプラズマの薬剤耐性判別技術の開発

秦 英司

農研機構・動物衛生研究部門 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

1. マイコプラズマ及び牛マイコプラズマ疾病について

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) は、グラム陽性菌グループであるテネリクテス門 (*Tenericutes*) モリクテス綱 (*Mollicutes*) に分類学上位置付けられ、コレステロール要求性かつ通性嫌気性の細菌群である。本綱に属する細菌の主な特徴として、低 G + C 含量 (約 23 ~ 41 mol%)、細胞壁合成能欠損、極小のゲノムサイズ (約 0.6 ~ 1.5Mbp) が挙げられる。遺伝子数も 500 ~ 1,000 個程度を保有するのみで、一般細菌で通常保有されている遺伝子群 (アミノ酸並びに脂肪酸合成酵素遺伝子群、クエン酸回路酵素遺伝子群など) を欠いている [1]。また、代謝活性が低く、培養にも 2 ~ 7 日程度を要し、培養に基づく多くの細菌学的検査も同様に長時間が必要になる。その結果、緊急を要する治療にこれら検査結果を活用することは困難である。

マイコプラズマは牛肺疫をはじめ肺炎、関節炎、中耳炎、乳房炎など様々な牛疾病の原因となるが、呼吸器粘膜や生殖器粘膜に生息する共生細菌としての側面も持つ。*Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* は主な病原種として認識されており、特に *M. bovis* は分離例が多く、ほかの原因種よりも病原性が高い。また、マイコプラズマ感染症は上行性感染に加え下行性感染が成立することが特徴であり、前述した様々な牛疾病が相互に関連する。さらに、強力な伝染性を示すことから、対応の遅れが大規模な感染事例に至る場合がある。起病性は、感染部位並びに感染菌種により大きく異なる。*M. bovis* や *M.*

bovis genitalium の乳房炎は、70CFU 程度の培養菌液の接種で容易に成立するが、実験的に呼吸器病を発現させるには病変部肺乳剤を接種する必要があり、感染成立は極めて困難である [2]。

米国における本疾病の損失額は、肉牛では年間 3,200 万ドル (主に増体や枝肉歩留まりの損失)、乳牛では年間 10,800 万ドル (主に乳房炎に伴う乳量や乳質の低下) と試算されている [3]。一方、我が国における本疾病の損失額は試算されていないが、牛の飼育頭数が米国の約 1/24 であることを考慮すれば数億円程度と推測される。

2. 牛マイコプラズマ性乳房炎の疫学的知見

マイコプラズマによる牛乳房炎は *M. bovis genitalium* 感染例が英国で初めて報告 (1960) され、*M. bovis* (1962) 並びに *M. californicum* (1969) 感染例は米国において最初に報告されている [2]。1960 年代に入り、世界の畜牛産業において省力多頭飼育方式が普及するのに伴い本病の発生が次々と報告されてきた感がある。我が国では熊本県で発生した *M. bovis* 感染例が初報告であり (1977)、当初は諸外国と異なり集団発生例はなかった [2]。しかしながら、2015 ~ 2017 年に実施した十勝地域における牛マイコプラズマ性乳房炎調査では、発生農場 21 件のうち、11 頭以上の集団感染例 6 件中 3 件が 101 頭以上の大規模感染例であった [4]。

乳房炎原因菌は感染経路により伝染性原因菌と環境性原因菌に大別されるが、マイコプラズマは両方の側面を持つ原因菌である。以前は主に搾乳作業を介し感染牛から感染拡大する伝染性原因菌と認識されていたが、生体外で一定期間生息可能

であることが後に確認され、汚染環境からの感染が懸念されるようになった。しかしながら、主な感染源はやはり感染牛と考えられ、乳房感染・呼吸器感染を問わず感染牛の導入や感染歴がある牛群への預託は、新たな感染牛及び感染牛群発生の主要なリスクとなる [5, 6]。また、稀な例であるが、感染精液による *M. bovis* 乳房炎発生の報告もある [7]。

感染牛の早期摘発は発生予防に不可欠であるが、感染牛の多くが不顕性感染であり、摘発が困難であることが明らかとなってきた。前述の十勝地域における発生農場 21 件でも 7 件で不顕性の *M. bovis* 乳房感染牛が認められ、4 件で不顕性 *M. bovis* 呼吸器感染牛並びに 1 件で不顕性 *M. bovis* 生殖器感染牛が認められた [4]。このような不顕性感染牛の存在は、牛群内あるいは疫学的に関連のある複数農場間における数年にもわたる感染持続と、その後の再発の主因であると考えられる [4]。また、感染搾乳牛が存在する農場には感染子牛も高い確率で存在し、両者間で給乳を介し病原菌株の感染が成立していることが示唆されている [4, 8]。一方、子牛期のマイコプラズマ感染と成長後の各種マイコプラズマ疾病の発病との関連については、今のところ不明である。これら潜在的なマイコプラズマ乳房感染を把握するには、定期的なバルク乳検査が最も効果的な対策である。本検査は 100～300 頭 (1 バルク) に 1 頭の感染個体を検出可能な高い感度を有し、1 サンプルで牛群全体をモニタリング可能であるため、作業効率並びに費用対効果の面からも現在最もお勧めできる検査法である。

農場の飼養・衛生管理の各種要因は、牛マイコプラズマ疾病の発生に大いに影響すると考えられている。牛マイコプラズマ性乳房炎発生農場に多く認められる要因として、①共同経営型 (企業型) 牧場であること、②他農場からの牛導入があること、③大規模牛群 (101 頭以上)、④フリーストールやフリーバーンのような Loose housing style の飼養形態が挙げられる。また、高泌乳牛群や原因菌不明の急性乳房炎歴がある牛群は、発生が多く認められる [9, 10]。本疾病発生を促す要因は、省力多頭飼育方式で多く認められることから、本

疾病の発生制御に省力多頭飼育方式は適していないことを再認識させる。一方、①タイストール、②搾乳前の乳頭開口部の清拭と、③布タオル清拭後の紙タオル清拭は、予防要因として挙げられている [9]。

3. 牛マイコプラズマ国内野外株の薬剤感受性調査

感染症を予防する上で最も望ましい対策は、ワクチン投与である。豚及び鶏マイコプラズマ感染症に効果的なワクチンは数多く開発され、我が国でも広く普及している。これらの多くは安定的な感染予防効果は期待できないが、重症化抑制の効果は期待できる [11, 12]。一方、牛マイコプラズマ感染症に対し、安定かつ顕著な効果が期待できるワクチンはこれまで存在しない [13]。牛マイコプラズマ疾病発生時の主な対策は、感染牛の早期発見と隔離・淘汰による蔓延予防、あるいは抗生剤治療であるが、どちらの対策にも長所と短所がある。前者は迅速に感染源を排除できるが、甚大な経済的損失を強いる場合がある。一方、後者は経済的損失が少ないが、原因菌株によっては治療効果が低く、潜伏 (不顕性) 感染や再発のリスクを残す場合がある。また、*M. bovis* は *M. bovis genitalium* や *M. californicum* より抗生剤治療が奏功し難いといわれている。

マイコプラズマは様々な抗生剤に対し自然耐性を示すことが知られており、治療に用いられる抗生剤は限定されている。マイコプラズマは細胞壁、リボ多糖体、葉酸の合成経路を備えていないため、これらを標的とする細胞壁合成阻害剤 (ペニシリン系抗菌剤、セファロスポリン系抗菌剤、糖ペプチド系抗菌剤、Fosfomycin)、Polymyxin、サルファ剤 / Trimethoprim に対し自然耐性である [14]。Rifampicin にも自然耐性であるが、こちらは標的タンパク質である RNA ポリメラーゼの遺伝子 (*rpoB*) に存在する耐性変異が原因である [14]。有効な抗菌剤は、タンパク質合成阻害剤 (マクロライド系 [MLs] 抗菌剤、テトラサイクリン系 [TCs] 抗菌剤、リンコマイシン系 [LCMs] 抗菌剤、フェニコール系抗菌剤、

プレウロムチリン系抗菌剤、アミノグリコシド系抗菌剤)や核酸合成阻害剤(ピリドンカルボン酸系 [PCAs] 抗菌剤)に限られており、特に MLs と TCs は第一選択薬として古くから認識されている [14]。しかしながら、これら抗菌剤に対する低感受性化が様々な家畜マイコプラズマ種で確認されている上、我が国では乳牛あるいは肉牛への使用が認められていない抗菌剤も多く、このような状況は治療をさらに困難にしている [14]。

著者は牛マイコプラズマ国内分離株の薬剤感受性調査を行い、低感受性株の出現状況を明らか

にした (図 1)。調査対象とした菌種は、*M. bovis* (1993～2020年分離株)と*M. californicum* (2005～2013年分離株)である。前者は難治性原因菌種として広く認識されており、後者は抗菌剤治療が期待できる原因菌種として認識されている。これら2菌種の国内野外株及び基準株である*M. bovis* PG45^T、並びに*M. californicum* ST-6^Tは、14員環 [14M] MLs 抗菌剤である Erythromycin 並びにオールドキノロン系抗菌剤である Flumequine に対し高い最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) を示し、自然耐性であること

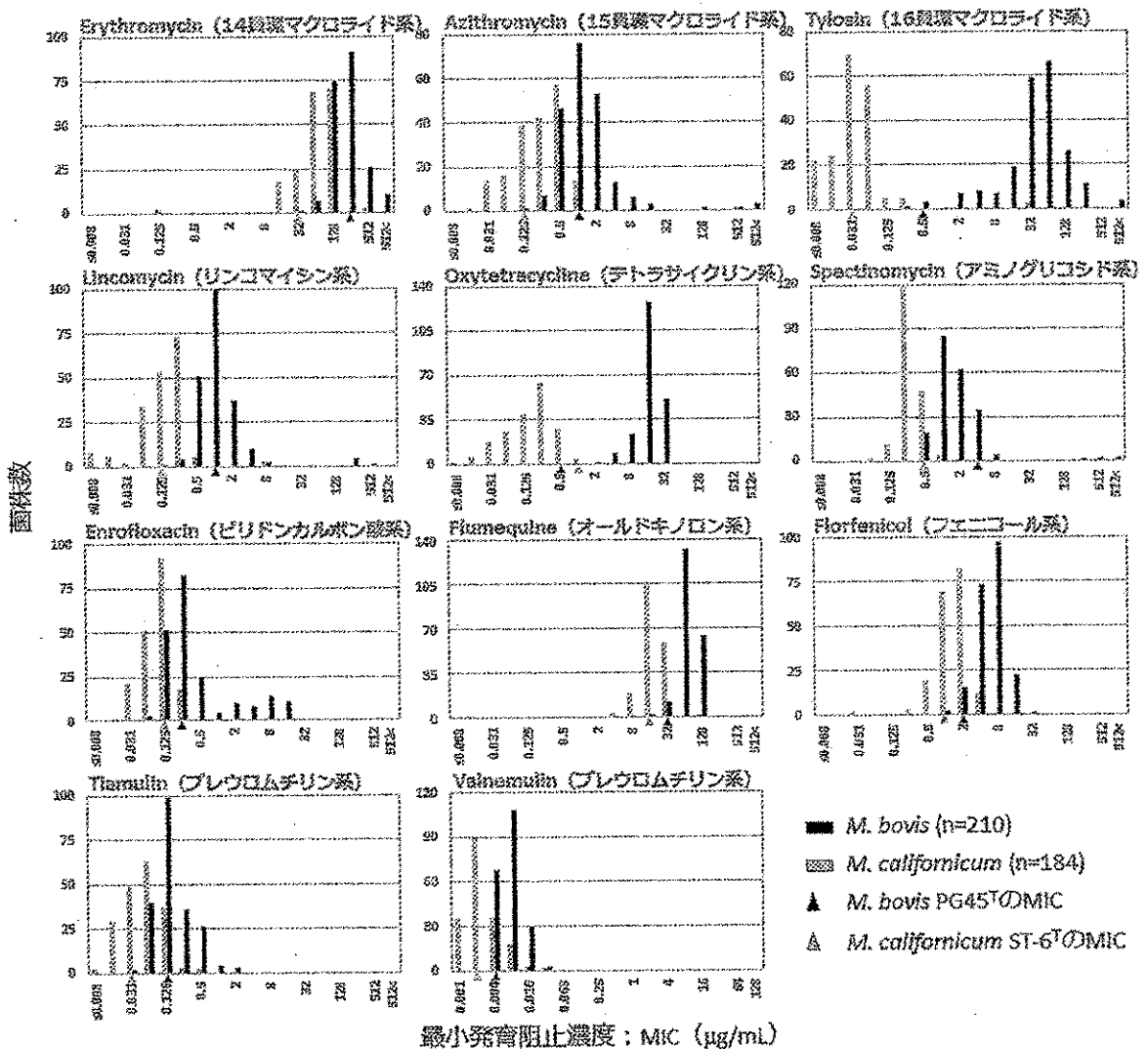


図 1 各抗菌剤に対する *M. bovis* 並びに *M. californicum* 国内野外株の MIC 分布

が明らかとなった [15, 16]。 *M. californicum* では、MLs と LCMs に対する低感受性株の散発的な出現が認められたが、どの供試薬剤に対しても、概ね感受性の維持が認められた [16]。一方、 *M. bovis* では 16MMLs と PCAs に対する MIC の二峰性分布が認められ、これら抗菌剤に対する低感受性化傾向が顕著であった [15]。さらに TCs に対する低感受性化は著しく、現在分離される野外株は全て低感受性株となっている [15]。また、15MMLs や LCMs に対する低感受性株の出現も散発的ではあるが確認された [15]。このように一次選択薬である 16MMLs や TCs に対する *M. bovis* 並びに *M. californicum* 国内野外株の感受性の違いが、抗菌剤治療の成否に大きく影響していると推測された。

各種抗菌剤に対する低感受性株の出現に係る要因を探るため、 *M. bovis* 国内野外株を対象に遺伝子型別法である Multilocus sequence typing (MLST) 解析を実施した。 *M. bovis* の MLST は、Register らにより開発され [17, 18]、ウェブサイト (<https://pubmlst.org/>) 上で sequence type

(ST) の決定及びデータの蓄積が可能である。これら菌株情報並びに型別結果は何処でもアクセス可能であり、海外株との遺伝学定背景の比較が容易となった。 *M. bovis* 国内野外株は、MLST により ST12 group, ST180 group, ST21 group に大別され、以前は ST12 group の蔓延が顕著であったが、2001 年以降は ST21 group が主要な ST group となっている (図 2A) [15]。ST21 group に型別される菌株の特徴として、16MMLs と TCs に対する低感受性が挙げられる (図 2B) [15]。ST21 group は北米起源の菌株群であり、牛生物資源の国際流通に伴い欧州でも侵入・蔓延が見られる。我が国でも長年北米から牛精液、牛受精卵、乳用繁殖牛などの牛生物資源を輸入してきたことが (図 3) [19]、ST21 group の国内侵入の主因と考えられる [20]。また、近年オーストラリアで優勢である ST52 subgroup に属する *M. bovis* の国内分離例が増えつつあり、乳用繁殖牛の主要輸入元国の変更 (北米→オーストラリア) が大いに影響していると考えられる (図 2A, 図 3) [20]。

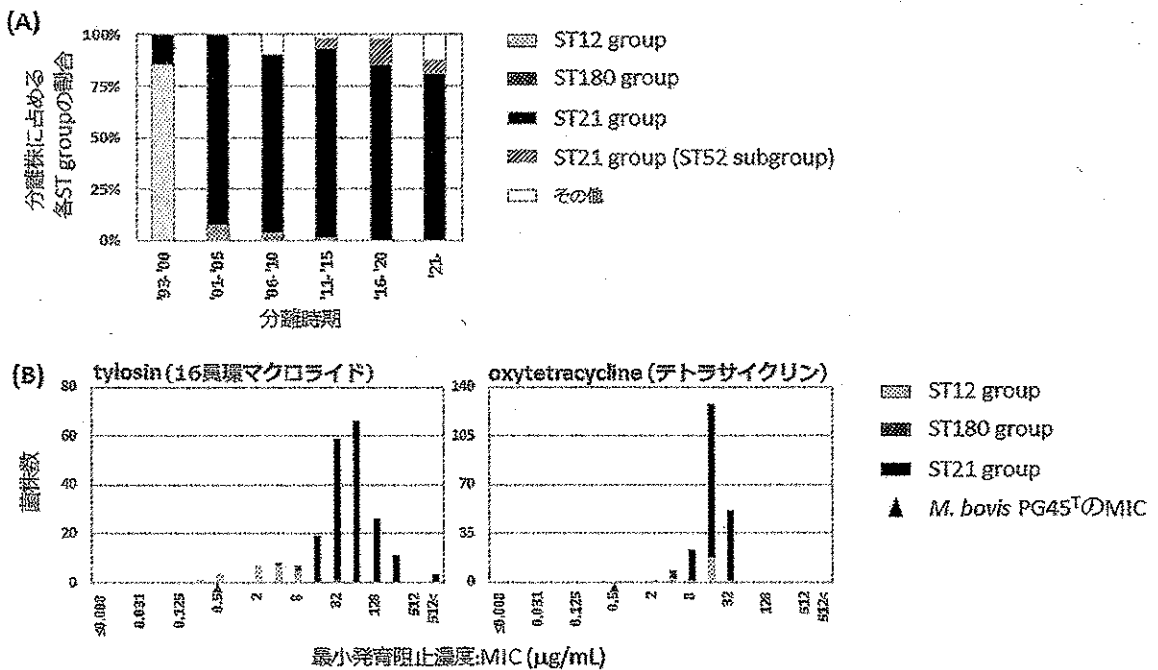


図 2 (A) *M. bovis* 国内野外株の各分離時期に占める ST group の出現状況, (B) MIC 分布と ST group の相関関係

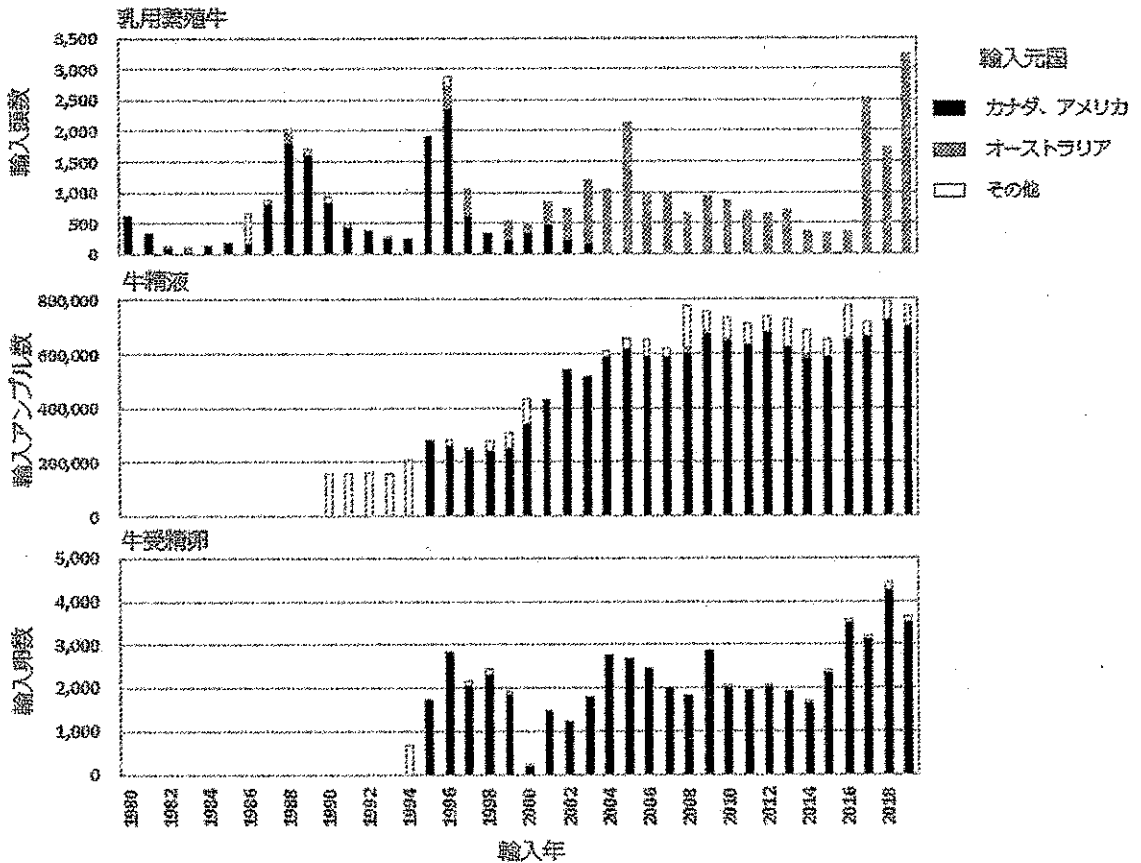


図3 牛由来生物資源の輸入元国の推移

4. 牛マイコプラズマにおける抗菌剤低感受性化変異の特定

薬剤耐性については様々なメカニズムが報告されているが、多くの薬剤耐性菌株が保有する薬剤耐性メカニズムは以下の3つに集約される。①抗菌剤の分解、あるいは修飾酵素遺伝子の獲得に伴う抗菌剤の不活化、②抗菌剤の作用点の変異、③抗菌剤の細胞内蓄積の阻害。これらのほかにも、④ 14MML 耐性株で認められる抗菌剤濃度上昇に伴う耐性の誘導、⑤ *tet(M)* 保有株に認められる抗菌剤作用点の保護による TC 耐性、⑥ パラアミノ安息香酸の産生量増加に伴うサルファ剤耐性に代表される標的酵素の基質過剰生産に伴う耐性などが知られている。マイコプラズマではこれらのうち①、②、③、⑤による抗菌剤感受性低下

の報告があるが、ほとんどの低感受性菌が保有する薬剤耐性メカニズムは②によるものである。特に、リボゾーム (r) RNA やリボゾームタンパク質の遺伝子変異によるタンパク質合成阻害剤に対する耐性と、DNA 合成酵素の遺伝子変異による PCAs 耐性が様々な菌種で報告されている [14, 21-23]。

M. bovis 及び *M. californicum* 国内低感受性野外株において、抗菌剤低感受性化へ関与する点突然変異として表1に示される7カ所が特定された(表1)。これらのうち、TCs 感受性低下に関与する 16S rRNA 遺伝子 (*rrs*) の 967 番目のアデニン→チミンの点突然変異 (*rrs* A967T) と、16MMLs 感受性低下に関与する 23S rRNA 遺伝子 (*rpl*) の 748 番目のグアニン→アデニン (*rpl* G748A) の点突然変異は、ST21 group に属する *M. bovis* 国内

表1 国内野外株で認められた Hybridization probe による融解曲線解析によって検出可能な抗菌薬感受性の変化に関する突然変異

マイコプラズマ種	標的遺伝子 ^a	突然変異点	感受性変化	対象抗菌薬
<i>M. bovis</i>	<i>rrs</i>	A965, A967	低下	TCs
<i>M. bovis</i>	<i>rrs</i>	C1192	低下	Spectinomycin
<i>M. bovis</i> , <i>M. californicum</i>	<i>rriI</i>	G748	低下	16MMLs
<i>M. bovis</i> , <i>M. californicum</i>	<i>rriI</i>	A2058, A2059	低下	MLs, LCMs
<i>M. californicum</i>	<i>rriI</i>	C2611T	上昇 低下	Erythromycin LCMs

^a*rrs*: 16S rRNA 遺伝子, *rriI*: 23S rRNA 遺伝子

野外株で共通に保有されている点突然変異であった [15]。また, *rriI* A2058n は, *rriI* A2059 における点突然変異が存在する低感受性株は *rriI* G748A のみ存在する低感受性株よりも 16MML に対し高度な感受性低下が認められた [15]。Erythromycin 並びに LCMs に対する感受性変化には, 23S rRNA の Peptidyl transferase center circle を構成する 2,057 番目の塩基及び 2,611 番目の塩基間での塩基対形成の有無が大きく影響している。*M. pneumoniae* や *Ureaplasma* 属菌のように, Erythromycin 感受性かつ LCMs 自然耐性を示す菌種では, *rriI* G2057 及び *rriI* C2611 であるため両塩基間で塩基対が形成されるが, Erythromycin 自然耐性かつ LCMs に対して感受性示す *M. bovis* や *M. californicum* を含む多くの牛マイコプラズマ種では, 本来 *rriI* A2057 及び *rriI* C2611 であるため, 両塩基間で塩基対が形成されない。しかしながら, これら菌種でも *rriI* C2611T の突然変異が存在する菌株では, *rriI* A2057 との間で塩基対形成が可能であるため, Erythromycin 感受性上昇及び LCMs 感受性低下が認められる [16]。ほかにも *rrs* C1192 において点突然変異が存在する *M. bovis* 野外株では, Spectinomycin に対する感受性低下が著しい。PCAs に対する主要な耐性機構は, DNA ジャイレース遺伝子 (*gyrA*, *gyrB*) 及び DNA トポイソメラーゼ IV 遺伝子 (*parC*, *parE*) におけるミスセンス突然変異の存在である。*M. bovis* 国内分離株では, これらのうち *gyrA* 及び *parC* の両方にミスセンス突然変異が共存している場合, 有意な感受性低下が認められた [15]。PCAs 低感受性株では, GyrA を構成する

76 番目のリシンから 94 番目のグルタミン間に加え, ParC 構成する 80 番目のセリンから 85 番目のアラニン間をコードするトリプレットにミスセンス突然変異が認められた。特に, GyrA の 83 番目のセリンと ParC の 80 番目のセリンにミスセンス突然変異の共存が認められる野外株では, 高度な感受性低下が認められた (ホットスポット) [15]。我が国における PCAs 低感受性株の出現状況は, 乳牛由来株と肉牛由来株間で大きく異なり, 2012 年以降に分離された乳牛由来株計 43 株のうち, *gyrA* と *parC* の両方にミスセンス突然変異が認められる株は 14 株 (32.6%) であり, そのうちホットスポットの組合せは 5 株 (11.6%) であったのに対し, 肉牛由来株計 50 株のうち *gyrA* と *parC* の両方にミスセンス突然変異が認められる株は 34 株 (68.0%) であり, そのうちホットスポットの組合せは 21 株 (42.0%) であった (図 4A) [20]。このように, 我が国の乳牛と肉牛で PCAs 低感受性株の出現が大きく異なる原因として考えられるのが, 両者間での PCAs 使用状況の違いである。図 4B に我が国における PCAs 購入量の推移を示しているが, 2012 年以降肉牛治療目的で購入される PCAs の購入量が増加していることがわかる [24] (図 4)。16MMLs 及び TCs 耐性変異を遺伝学的特性として保有している ST21 group と異なり, PCAs 耐性変異を保有する特定の菌株群の存在は確認されておらず, これら PCAs 低感受性株は出現と消滅が短期間で繰り返されていると考えられる。したがって, PCAs の使用抑制は低感受性株の出現抑制に直に反映するものと推測される。これらの点突然変異と抗菌剤低感受性化の

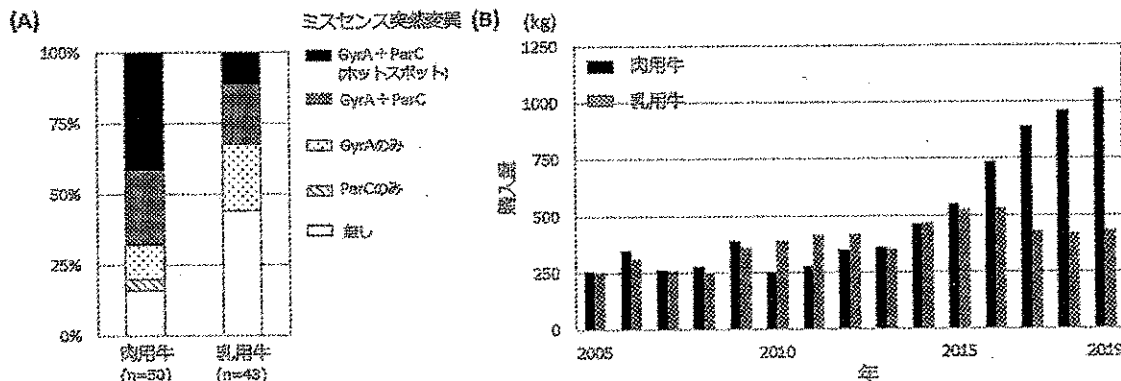


図4 (A) ピリドンカルボン酸系抗菌剤低感受性化ミスセンス突然変異保有株の *M. bovis* 国内野外株における分離状況 (2012年以降分離株), (B) ピリドンカルボン酸系抗菌剤の国内購入量の推移

相関関係は、人為的に作成した *M. bovis* 及び *M. californicum* 作出変異株でも再現されている [16, 25]。

5. 簡易・迅速に実施可能な薬剤感受性判別技術の開発

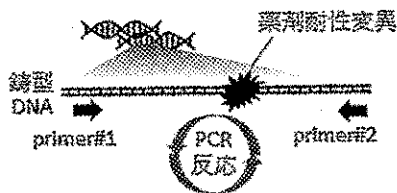
感染症治療の際、原因菌に対する有効な抗菌剤を迅速に把握することは、治療の成否に大きく影響する。多くの病原細菌では、薬剤感受性ディスクを用いた Kirby-Bauer 法や E テストストリップを用いた E テストなど、簡易迅速な薬剤感受性試験法が古くから確立されている [26]。これらは 2~4 日程度で実施可能なだけでなく、明確な breakpoint も設定されている [27]。一方、牛マイコプラズマを対象とした簡易迅速な薬剤感受性検査法は確立されておらず、従来の微量液体希釈法あるいは寒天平板希釈法による MIC 測定が薬剤感受性を検査するための唯一の手段となっている。これら薬剤感受性試験法は、検体からのマイコプラズマの分離から試験結果が得られるまで 2~3 週間を要するだけでなく、作業が煩雑で費用も掛かるため、緊急を要する臨床現場に導入することは困難である [28]。そのため、ほとんどの場合、牛マイコプラズマ病罹患畜の治療には、薬剤感受性試験を未実施のまま抗菌剤が選択されている。また、先述のとおりマイコプラズマは様々な抗菌剤に対し自然耐性を示し、抗菌剤選

択肢の幅が狭いこと、さらに *M. bovis* で見られるような低感受性株の出現と蔓延が、治療を困難にさせる一因となっている。そこで著者らは、懸案事項であった牛マイコプラズマの薬剤感受性判別法の簡易迅速化を試みた。*M. bovis* 並びに *M. californicum* 国内野外株で薬剤低感受性化に係る突然変異 (表 1) が特定できたため、これらを直接検出する手法を開発した。検出手法として、様々な長所を持った 1 塩基多型 (SNP) 検出技術である、Hybridization probe による融解曲線解析を用いた。本法の主な長所として感度の高さが挙げられ、僅か 1 塩基の SNP であっても検出可能である。また、検出領域をプローブ上の狭い範囲に設定可能であるため、標的以外の SNP を検出する危険性が少ない。さらに、迅速かつ簡便に実施可能な解析法であることが長所として挙げられる [29]。このプローブは、光エネルギーを吸収可能な蛍光色素 (FITC) が 3' 末端に結合した donor probe と、光エネルギーを発散可能な蛍光色素 (LCRed640) が 5' 末端に結合した acceptor probe で構成されており、両プローブ間に起きる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により、両プローブが鑄型 DNA 鎖と二本鎖を形成する状態でのみ蛍光を発するよう設計されている。低温条件下では両プローブと鑄型 DNA 鎖が結合し、近接した FITC と LCRed640 の間で FRET が起こり蛍光を発するが、高温条件下では鑄型 DNA 鎖から両プローブが解離し、蛍光が消滅する。この蛍光

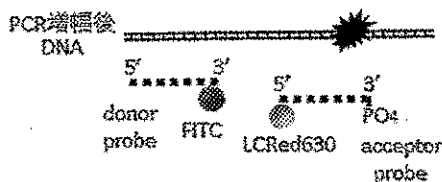
の消長は、融解曲線解析により計測され、標的となる塩基配列（遺伝子領域）に点突然変異が存在すればプローブが剥がれやすくなり、ピーク温度である T_m 値が非変異型の融解曲線よりも明確に低下する（変異型）。また、標的となる塩基配列がゲノム内に複数存在する場合、その一部のみで変異が存在すれば二峰性の融解曲線に変化する（ヘテロ型）（図5）。*M. bovis* や *M. californicum* では、多くの抗菌剤低感受性化変異が存在する *rrs-rrl* オペロンがゲノム内に通常2カ所存在するため、変異型あるいはヘテロ型の両方の変化が認められるだろう。ちなみに変異型とヘテロ型で低感受性化の程度に有意差は認められない。検査作業は、①検体からのDNAサンプル調整、②標的となる遺伝子領域のPCR増幅と電気泳動、③Hybridization probeを用いた融解曲線解析の

手順で行われ、所要時間は4時間程度である。本判別法の詳細については、秦らの報告を参考にされたい [15, 16]。一方、PCAsの耐性変異は、*gyrA* 及び *parC* におけるミスセンス突然変異の共存を検出する必要がある。標的となる遺伝子領域にはサイレント突然変異も多く存在するため、ミスセンス突然変異とサイレント突然変異を区別できない Hybridization probe を用いた融解曲線解析では、正確な検査結果の入手は不可能である。そのため、DNAシーケンシングによる *gyrA* 及び *parC* の塩基配列の解析が必要となる。Lysnyanskyらは、*M. bovis* の *gyrA* 及び *parC* を標的としたPCR増幅及びDNAシーケンシングに有効なDNAプライマーを報告しており、本法を用いれば6時間程度でPCAs耐性変異の存在を確認可能である [30]。

① PCRで標的DNAを増幅



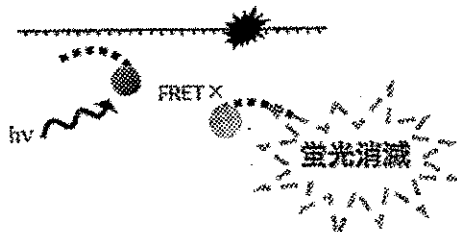
② プローブ添加



③ 低温状態でプローブが標的DNAに結合



④ 温度上昇とともにプローブが外れる



⑤ 融解曲線解析

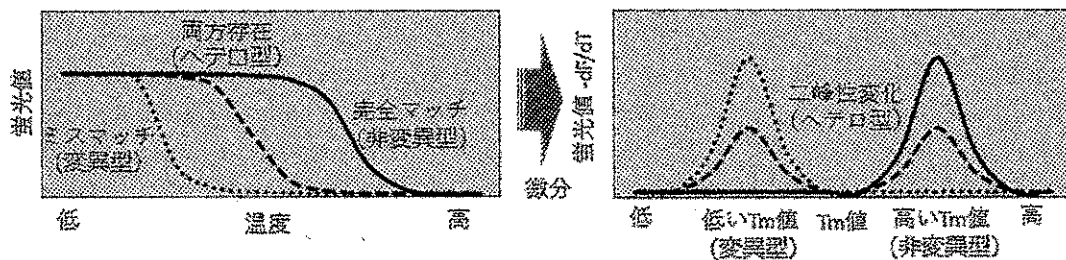


図5 Hybridization probe を用いた融解曲線解析による標的変異の検出原理と手順

6. おわりに

本稿では、牛マイコプラズマ性乳房炎の疫学的知見、主要な原因種である *M. bovis* 及び *M. californicum* 国内野外株の遺伝学的背景、各種抗菌剤に対する感受性調査結果、低感受性化に係る変異の特定、並びにこれら突然変異検出に基づく簡易・迅速な抗菌剤感受性判別技術の開発について述べた。読者諸兄には牛マイコプラズマ疾病対策や治療にこれら知見や技術を積極的に活用していただき、治癒率の向上、損害額の低減、抗菌剤使用量の抑制などに繋げていただければ幸いである。なお、本調査・研究は、以下の研究助成金並びに事業によってサポートされた。この場を借りて深謝申し上げる。

①農林水産省・委託プロジェクト「薬剤耐性問題に対応した家畜疾病防除技術の開発」(2017-2022)

②社団法人中央畜産会・生産段階における防疫対策強化事業（地域自衛防疫強化特別支援事業）慢性感染症清浄化支援対策事業（2016-2017）

要約

牛マイコプラズマは呼吸器粘膜や生殖器粘膜を主な生息域とし、呼吸器病、生殖器病、関節炎、乳房炎など様々な牛疾病の原因となる微生物である。主な原因種として、*M. bovis*、*M. bovisgenitalium*、*M. californicum* が挙げられるが *M. bovis* はほかの二菌種と違い抗菌剤治療が奏効し難い。そこで *M. bovis* 国内野外株の薬剤感受性を調査したところ、2000年以降分離された全野外株が本疾病の第一選択薬である 16MMLs 抗菌剤並びに TCs 抗菌剤に対し低感受性を示すことが明らかとなった。これら低感受性株は、繁殖用牛・精液・受精卵といった生物資源の主な輸入元国である北米やオーストラリアから侵入し国内に蔓延したものと推測される。また、肉用牛由来野外株では高率に PCAs 抗菌剤に対する低感受性株が確認され、肉用牛における PCAs 抗菌剤の使用量の増加

が低感受性株の出現には深く関与していると推測された。マイコプラズマにおける薬剤低感受性化は、主に抗菌剤作用点の変異によるものであり、これら点突然変異を直接検出する方法を開発することで薬剤感受性判別に要する時間を大幅に短縮することが可能となった。本判別法を治療に導入することにより、*M. bovis* 及び *M. californicum* が関与する牛疾病の治癒率向上とともに、適切な抗菌剤選択による抗菌剤使用量低減への貢献が期待できる。

引用文献

- 1) Razin S, Yogev D, Naot Y: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 1094-1156 (1998)
- 2) 清水高正：マイコプラズマとその実験法，近代出版，東京（1988）
- 3) Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D: *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J Vet Intern Med*, 25, 772-783 (2011)
- 4) 秦 英司，村井清和，樋口豪紀：事業報告書 生産段階における防疫体制支援強化事業自衛防疫体制強化推進事業【牛マイコプラズマ乳房炎】～牛マイコプラズマ乳房炎の発生状況に関する疫学解析～，家畜衛生対策推進協議会（2018）
- 5) Hata E, Suzuki K, Hanyu H: Molecular epidemiology of cases of *Mycoplasma californicum* infection in Japan. *Appl Environ Microbiol*, 80, 7717-7724 (2014)
- 6) Punyapornwithaya V, Fox LK, Hancock DD: Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. *Prev Vet Med*, 93, 66-70 (2010)
- 7) Haapala V, Pohjanvirta T, Vähänikkilä N: Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. *Vet Microbiol*, 216, 60-66 (2018)
- 8) Itoh M, Aoki T, Furuoka M: Association between *Mycoplasma pneumoniae* outbreaks in calves and *Mycoplasma mastitis* in milking cows on dairy farms. *Japanese J Vet Res*, 67, 215-220 (2019)

- 9) Fujimoto Y, Ito H, Higuchi H: A case-control study of herd- and cow-level risk factors associated with an outbreak of *Mycoplasma* mastitis in Nemuro, Japan. *Prev Vet Med*, 177, 104946 (2020)
- 10) Murai K, Higuchi H: Prevalence and risk factors of *Mycoplasma bovis* infection in dairy farms in northern Japan. *Res Vet Sci*, 123, 29-31 (2019)
- 11) 新居つかさ：－日本で使用されている動物用ワクチン (12)－豚用ワクチンの概説 13 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症ワクチン (不活化・混合不活化ワクチン) 日獣会誌, 64, 198-200 (2011)
- 12) 奥地七星：－日本で使用されている動物用ワクチン (18)－鶏用ワクチンの概説 9 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症ワクチン (生・不活化・混合生・混合不活化ワクチン) 10 マイコプラズマ・シノピエ感染症ワクチン (生・混合生ワクチン) 日獣会誌, 64, 687-691 (2011)
- 13) Dudek K, Szacawa E, Nicholas RAJ: Recent developments in vaccine for bovine mycoplasmosis caused by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Vaccines*, 9, 549 (2021)
- 14) Gautier-Bouchardon AV: Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol Spectr*, 6, (2018)
- 15) Hata E, Harada T, Itoh M: Relationship between antimicrobial susceptibility and multilocus sequence type of *Mycoplasma bovis* isolates and development of a method for rapid detection of point mutations involved in decreased susceptibility to macrolides, lincosamides, tetracyclines, and spectinomycin. *Appl Environ Microbiol*, 85, e00575-19 (2019)
- 16) Hata E, Nagai K, Murkami K: Mutations associated with change of susceptibility to lincosamides and/or macrolides in field and laboratory-derived *Mycoplasma californicum* strains in Japan, and development of a rapid detection method for these mutations. *Vet Microbiol*, 229, 81-89 (2019)
- 17) Register KB, Lysnyansky I, Jelinski MD: Comparison of two multilocus sequence typing schemes for *Mycoplasma bovis* and revision of the PubMLST reference method. *J Clin Microbiol*, 58, e00283-20 (2020)
- 18) Register KB, Thole L, Rosenbush RF: Multilocus sequence typing of *Mycoplasma bovis* reveals host-specific genotypes in cattle versus bison. *Vet Microbiol*, 175, 92-98 (2015)
- 19) 農林水産省動物検疫所：動物検疫年報 (1980-2019)
- 20) Hata E: Genomic and molecular epidemiological analyses and antimicrobial susceptibility of bovine mycoplasmas in Japan. *JARQ*, 57(2), (2023) [in press]
- 21) Lysnyansky I, Borovok I: A GC-rich prophage-like genomic region of *Mycoplasma bovirhinis* HAZ141_2 carries a gene cluster encoding resistance to kanamycin and neomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 65, e01010-20. (2021)
- 22) Roberts MC, Koutsky LA, Holmes KK: Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal *tetM* sequences. *Antimicrob Agents Chemother*, 28, 141-143 (1985)
- 23) Tatay-Dualde J, Prats-van der Ham M, Gaurivaud P: Efflux Might Participate in Decreased Susceptibility to Oxytetracycline in Contagious Agalactia-Causative *Mycoplasma* spp. *Animals (Basel)*. 11, 2449 (2021)
- 24) 農林水産省動物医薬品検査所：動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報 (別冊) 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量 (2005-2019)
- 25) Sulyok KM, Kreizinger Z, Wehmann E: Mutations associated with decreased susceptibility to seven antimicrobial families in field and laboratory-derived *Mycoplasma bovis* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 61, e01983-16 (2017).
- 26) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer J Clin Pathol*, 45, 493-496 (1966)
- 27) CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. CLSI document VET01S, Wayne, PA, USA. (2015)
- 28) Hannan PC: Guidelines and recommendations

- for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmology. Vet Res, 31, 373-395 (2000)
- 29) Lyon E: Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. Expert Rev Mol Diagn, 1, 92-101 (2001).
- 30) Lysnyansky I, Mikula I, Gerchman I: Rapid detection of a point mutation in the *parC* gene associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Mycoplasma bovis*. Antimicrob Agents Chemother, 53, 4911-4914 (2009)

Development of antimicrobial resistance discrimination method for bovine mycoplasma

Eiji HATA

Bacteria Group, Division of Infectious Animal Disease Research, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Kannondai 3-1-5, Tsukuba 305-0856, Japan

Mycoplasma causes variety of bovine diseases, such as pneumoniae, arthritis, mastitis, otitis, pneumonia, and urogenital diseases, and often cause disease of a chronic and persistent nature. *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma californicum* are recognized as frequent causal species in Japan. Slow growth is a bacteriological characteristic of mycoplasmas, and colony formation usually takes 2 to 7 days. As many conventional examination methods for mycoplasmas are based on culturing, such methods are time-consuming and thus cannot be applied in pressing clinical settings. In contrast, examination methods without culturing such as direct detection and typing of bacterial DNA from specimens can provide clear results quickly and easily. Author attempted to develop of genetic antimicrobial resistance discrimination method that can be utilized in antimicrobial therapy. After the identification of mutations involved in decreased susceptibility to antimicrobial agents, the melting curve assay by hybridization probes was developed to detect them clearly. This method has made it possible to significantly reduce the time and procedure required to determine antimicrobial susceptibility.

討 論 (座長：川西路子 動物医薬品検査所)

質問 (浅井鉄夫 岐阜大学)

ヘテロの集団をPCRで検出すると二峰性になるという結果だが、その際の薬剤の使用に関してどのように解釈すればよいか。

答 (秦 英司)

マイコプラズマの場合、ターゲットとなっている16SrRNA, 23SrRNA 遺伝子は2オペロンあり、1つに変異がなくもう一方に耐性変異がある場合、二峰性(ヘテロ)となる。2つ共に変異があるホモ型と比べると、同等の感受性があり、ホモでもヘテロでもMICは下がっている。

質問 (浅井鉄夫 岐阜大学)

キノロンの耐性に関して、GyrA, ParCの2つに変異が必要ということであったが、片方のみに変異がある株数はどれくらいか。両方に変異がある株が増加する際は、一方に変異のある株が増えるなどの予測は可能か。

答 (秦 英司)

ParCに変異が入っている株は少ないが、GyrA, 特にセリン83番をコードする248番目のシトシンにおける変異は、国内の野外株の約50%で認められる。それらの株もParCに変異がないため、表現系については感受性であるが、ParCに変異が入れば低感受性株(耐性)になる。論文発表後、肉牛・乳牛での検

査を続けたが、肉牛では70%程度のParC変異が見つかっており、耐性であることがわかった。

質問 (河合一洋 麻布大学)

今回のサンプルは乳房炎、肺炎など様々な疾患牛から検出されているのか。

答 (秦 英司)

様々なサンプルから抽出されている。最初のデータ(各抗生剤に対する国内野外株の薬剤感受性)を調べたときに、呼吸器病などのサンプルが多いことがわかった。

質問 (河合一洋 麻布大学)

国内の肺炎症例におけるマクロライド耐性が報告されており、我々も乳房炎におけるマクロライド耐性について論文発表している。肺炎と乳房炎の疫学的関連性が関係しているのではと考える。フルオロキノロン耐性に関して我々も調べており、マクロライドとフルオロキノロン耐性があると現場では使う薬がなくなる。フルオロキノロン耐性に関しても迅速に確認することができるか。

答 (秦 英司)

現在は乳汁のみの検査であるが、鼻汁からの検査も可能だと。ただ鼻汁は粘稠性が高いので、一晚ブロスなどで培養し、その菌液を使えばよい結果が得られると考える。