

原 著

岩手県南地域において分離された *Mycoplasma bovis* の薬剤感受性調査

戸塚知恵¹⁾, 大山貴行¹⁾, 秦 英司²⁾

要 約

2015年度から2020年度までに岩手県南地域13戸27頭から分離された *Mycoplasma bovis* 計28株の薬剤感受性及び感受性低下に関わる点突然変異を調査した。16員環マクロライド系及びテトラサイクリン系抗菌剤には全株が低感受性を示し、これに関連する点突然変異が認められた。加えて、15員環マクロライド系抗菌剤には2戸2株、フルオロキノロン系抗菌剤には1戸4株、フェニコール系抗菌剤には1戸3株が低感受性を示し、関連する点突然変異はフルオロキノロン系抗菌剤の低感受性株にのみ認められた。背景には抗菌剤使用による選択圧があったと考えられ、*M. bovis* 感染牛の治療の際は、原因菌の特定と感受性試験結果に基づく適切な薬剤選択が治癒率の向上及び薬剤耐性化を防ぐために重要である。

キーワード : *Mycoplasma bovis*, 薬剤感受性, 抗菌剤, 点突然変異

Mycoplasma bovis は、牛呼吸器病症候群 (BRDC) の原因菌の一つであり、牛に重篤な呼吸器病を引き起こすほか、中耳炎、関節炎、乳房炎等様々な疾病の原因となる。これらの疾病は短期間にまん延し難治性症例が多いため、経済的被害が大きい。*M. bovis* 感染予防を目的としたワクチンは存在するが、安定した効果は期待できない。そのため、感染牛の摘発と隔離・淘汰が主な対応策となるが、抗菌剤による治療が施される場合もある [1, 2]。

マイコプラズマにおける薬剤感受性低下は、抗菌剤が作用するリボソーム及び各種蛋白質遺伝子の突然変異による変化が主な原因となる。これら遺伝子変異と影響を受ける抗菌剤の種類の間関係は一部特定され、当該遺伝子変異の検出により、病原菌株の薬剤感受性を概ね把握できる [3, 4]。1999年以降わが国では、マイコプラズマ疾病の主な治療薬である16員環マクロライド系やテトラサイクリン系抗菌剤に対し、これら抗菌剤の低感受性化に関わる点突然変異を保有す

る *M. bovis* 野外株が広く浸潤している。また、フルオロキノロン系抗菌剤に対する低感受性 *M. bovis* 野外株も散見される [3]。治療に用いる抗菌剤の選択には各地域における薬剤感受性傾向の把握が不可欠であるが、県南地域における *M. bovis* 野外株の薬剤感受性傾向は未だ知られていない。そこで、薬剤感受性及び感受性低下に関わる点突然変異調査を実施し、既報 [3] の国内調査結果と比較するとともに、管内家畜診療所で用いられる抗菌剤の使用実態との関連性を検討した。

材料と方法

供試株 : 2015年度から2020年度までに県南地域の13戸27頭 (黒毛和種13頭, ホルスタイン種10頭, 交雑種4頭) から分離された *M. bovis* 計28株を用いた。これら野外株の由来は、何らかの臨床症状 (呼吸器症状, 中耳炎, 乳房炎等) を呈した際に採取された鼻腔スワブ (7株), 肺 (10株), 耳管洗浄液 (4株) 及び

1) 岩手支会 岩手県県南家畜保健衛生所 〒023-0003 奥州市水沢佐倉河字東館41-1

連絡担当者 (E-mail) : 戸塚知恵 (murai-c@pref.iwate.jp)

2) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門
疾病対策部生物学的製剤製造室製造科兼動物感染症研究領域細菌グループ

乳汁 (7 株) であった。

薬剤感受性試験：微量液体希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した [5]。本試験には、タイロシン (TS)、チルミコシン (TMS)、ガミスロマイシン (GAM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、エンロフロキサシン (ERFX)、マルボフロキサシン (MAR)、チアンフェニコール (TP)、フロロフェニコール (FFC) の 8 薬剤を用いた。それぞれの MIC を *M. bovis* 基準株 (PG45) と既報 [3] の国内野外株 MIC 分布と比較し、明らかに高値の MIC を低感受性と判定した。薬剤感受性低下に関与する点突然変異調査は、各農場から抽出した計 15 株について既報 [3] に従い実施した。

抗菌剤の使用実態調査：管内 4 診療所に所属する獣医師 6 名を対象に聴き取り調査を実施した。

成 績

薬剤感受性：16 員環マクロライド系抗菌剤 (TS, TMS) 及びテトラサイクリン系抗菌剤 (OTC) の MIC はいずれも全株が高値を示し、既報 [3] と同等の値であった (表 1, 図 1)。16 員環マクロライド系抗菌剤の低感受性化に関わる 23S リボゾーム RNA 遺伝子 (*rrl*) の 748 番目のグアニン (*rrlG748*) における点突然変異及びテトラサイクリン系抗菌剤の低感受性化に関わる 16S リボゾーム RNA 遺伝子 (*rrs*) の 965 番目及び 967 番目のアデニン (*rrsA965*, *rrsA967*) における点突然変異が全株に確認された。

フルオロキノロン系抗菌剤 (ERFX, MAR) の MIC 分布は二峰性であり、1 戸 (A 農場) 4 株の MIC が明らかな高値を示した (ERFX : 16~64 $\mu\text{g/ml}$, MAR : 64 $\mu\text{g/ml}$)。加えて、これら A 農場由来株では、高度感受性低下に関与する変異の組み合わせである DNA ジャイレース (*GyrA*) の 83 番目セリンのフェ

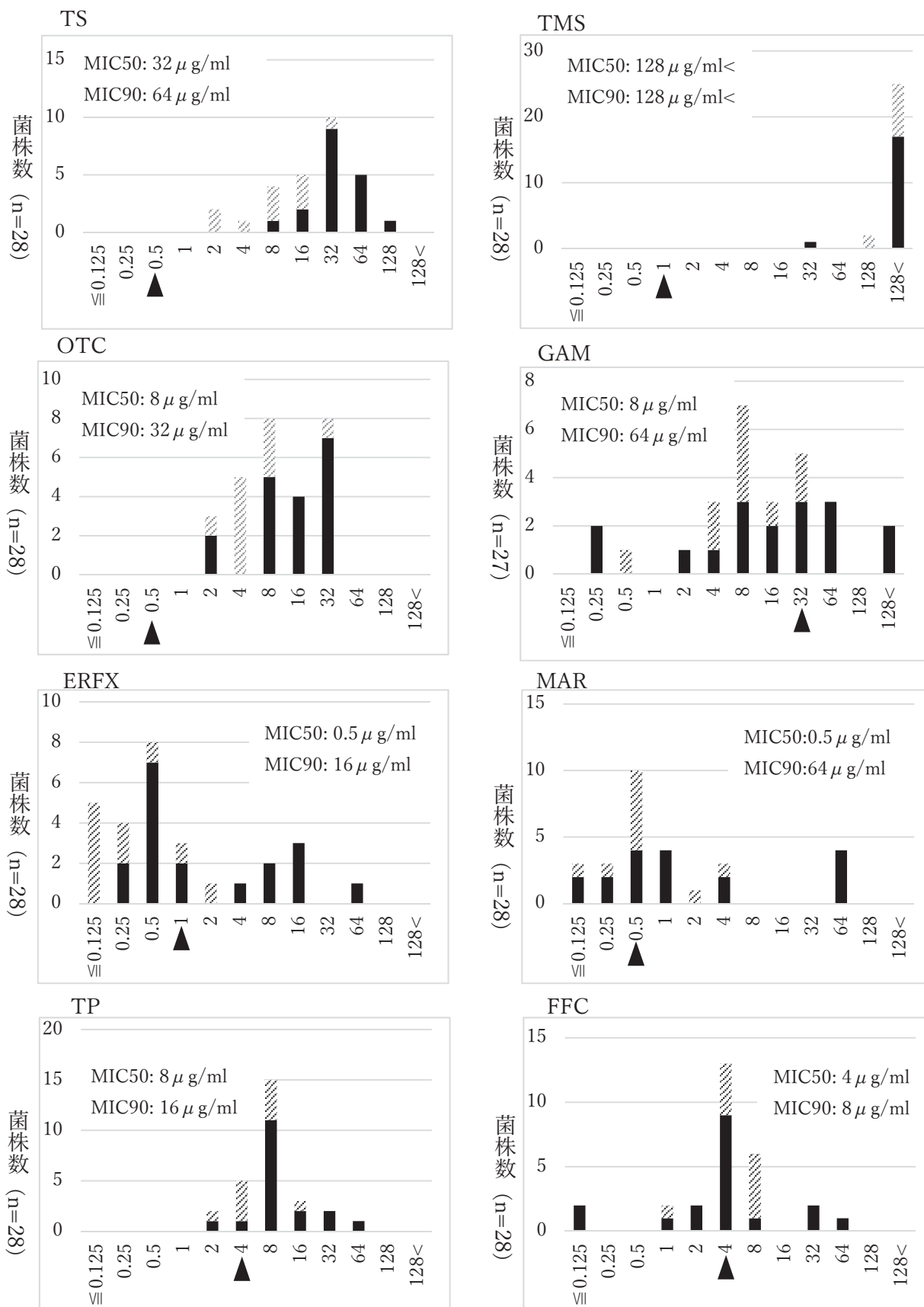
ニルアラニンへの変異及びトポイソメラーゼ (ParC) の 80 番目セリンのイソロイシンへの変異が確認され、MIC の結果とも一致した。一方、B 農場及び C 農場の 2 株では *GyrA* の 87 番目グルタミン酸のバリンへの変異が認められ、ParC については A 農場由来株と同様の変異が認められた。しかしながら、これらは高度感受性低下に関与する組み合わせでなく、MIC はわずかな高値を示すのみであった (B 農場由来株 MIC ERFX : 8 $\mu\text{g/ml}$, MAR : $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$, C 農場由来株 MIC ERFX, MAR それぞれ 4 $\mu\text{g/ml}$)。

15 員環マクロライド系 (GAM) 及びフェニコール系抗菌剤 (TP, FFC) に対する明らかな低感受性株は、それぞれ 2 戸 (D 農場, E 農場) 2 株及び 1 戸 (F 農場) 3 株で認められた (D 農場及び E 農場由来株 MIC GAM : それぞれ 128 < $\mu\text{g/ml}$, F 農場由来株 MIC TP, FFC : 32~64 $\mu\text{g/m}$)。これらに関連する点突然変異は確認されなかった。

抗菌剤の使用実態：管内では、抗菌剤の使用指針を定めている診療所はなく、獣医師個人の裁量で抗菌剤の使用が決定されていた。様々な臨床症状の発現は、獣医師が抗菌剤治療を実施する契機となっていたが、とりわけ発熱は抗菌剤治療の実施を決断する臨床症状として最も多く挙げられた。他にも呼吸器症状 (気管雑音, 肺雑音, 呼吸速迫) や食欲低下などの全身状態の悪化も抗菌剤治療実施の契機となっていた。中耳炎 (耳漏, 耳下垂) はマイコプラズマ感染を疑う主症状であるが、原因菌が他の一般細菌であっても、マイコプラズマ感染の場合と同様に第一選択薬としてフェニコール系抗菌剤、第二選択薬としてフルオロキノロン系抗菌剤が多く使用されていた。獣医師によっては、16 員環マクロライド系抗菌剤の使用も認められ、第一選択薬及び第二選択薬に同系統の抗菌剤を用いている場合もあった (表 2)。

表 1. 8 抗菌剤に対する管内 *M. bovis* 野外株の MIC 範囲, MIC₅₀ 及び MIC₉₀

抗菌剤名	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC _{PG45}
TS	2-128	32	64	0.5
TMS	32-128<	128 <	128<	1
OTC	2-32	8	32	0.5
GAM	0.25-128<	8	64	32
ERFX	≤ 0.125 -16	0.5	16	1
MAR	≤ 0.125 -64	0.5	64	0.5
TP	2-64	8	16	4
FFC	≤ 0.125 -64	4	8	4



各グラフの縦軸は菌株数、横軸は最小発育阻止濃度 MIC(μg/ml)

■ :肉用牛 ▨ :乳用牛 ▲ : PG45 の MIC

図1 各抗菌剤の MIC 分布と分離株の由来

表 2. 管内診療所における抗菌剤選択実態

獣医師	呼吸器病治療の薬剤		マイコプラズマ治療の薬剤	
	第一選択	第二選択	第一選択	第二選択
A	FFC	ERFX, MAR	ERFX, MAR	ERFX, MAR
B	TMS	TS	MAR, ORFX	FFC
C	FFC	ERFX	TP	ERFX
D	FFC	ERFX	FFC	ERFX
E	TP	FFC	TP	FFC
F	FFC	ERFX	FFC	OTC, TMS

考 察

わが国では、16員環マクロライド系及びテトラサイクリン系抗菌剤に対する低感受性株が蔓延しているが、県南地域においても同様であった。

フルオロキノロン系抗菌剤の MIC 分布は既報 [3] と異なり二峰性であったが、本調査では少数の高度低感受性株が存在したためであり、MIC₅₀ 値は既報と同等であったことから概ね同抗菌剤に対する感受性は良好と思われた。M. bovis のフルオロキノロン系抗菌剤の感受性低下には、GyrA 及び ParC のキノロン耐性決定領域におけるミスセンス変異の共存が関与し、両者の組み合わせにより感受性低下の度合いが異なる [3]。本調査においても、確認された変異の組み合わせと MIC 値の上昇度合いが一致する結果であった。抗菌剤の使用量の増加は、薬剤耐性菌の選択圧を高めることが知られており、疫学的には抗菌剤の使用量と薬剤耐性菌の出現との間に正の相関関係がある [6]。フルオロキノロン系抗菌剤に対する低感受性株は、全て肉用牛由来であった (図 1)。A 農場では同居牛の治療に伴う抗菌剤の選択圧があったと推察され、感受性回復のため他の抗菌剤への転換が必要と考えられた。動物用医薬品として承認されているフルオロキノロン系注射薬のうち、原末換算としての年間使用量 (販売量) は、エンロフロキサシンは肉用牛 (550kg) と乳用牛 (398kg) 間において大きな差はないが、マルボフロキサシンは肉用牛 (409kg) に対して乳用牛では使用されていなかった [7]。県内での使用実態も同様の傾向があるとした場合、この使用量の差により、肉用牛では乳用牛と比較してフルオロキノロン系抗菌剤に対する低感受性株が分離される頻度が高いと考えられるため、治療の際には原因菌株の感受性の確認が特に重要と思われた。

rrlA2058 及び rrlA2059 における点突然変異はマクロライド系抗菌剤及びリンコサミド系抗菌剤全般の低感受性化に関与し [3]、フェニコール系抗菌剤に対す

る低感受性株では rrlA2062 における点突然変異の出現が報告されている [11]。本調査において、これら点突然変異は確認されなかった。15員環マクロライド系抗菌剤に対する低感受性株が分離された D 農場及び E 農場では、同抗菌剤の使用歴は確認できなかったが、いずれも複数農場から牛の導入がある肥育農場であった。導入元における抗菌剤使用実態は不明であるが、今回の検索領域とは別領域において点突然変異の影響があった可能性も考えられた。フェニコール系抗菌剤に対する低感受性株が分離された F 農場では毎年呼吸器病が流行しており、治療に伴う抗菌剤の選択圧があった可能性が高いと思われた。

マイコプラズマの場合、in vitro における薬剤感受性の評価には、CLSI が規定するブレイクポイントの設定がないが、BRDC の起因菌であり呼吸器疾患の病原体である Pasteurella multocida のブレイクポイントが参照される [8]。これに基づく場合、FFC の有効 MIC 値は 2 µg/ml 以下であり、8 µg/ml 以上の場合に耐性と推測される [9]。本調査の FFC (MIC₉₀) は 8 µg/ml であり、既報 [3] の M. bovis 野外株においても高い MIC₉₀ 値 (16 µg/ml) が報告されている。in vitro の結果が必ずしも生体内での有効性と一致するわけではないが、フェニコール系抗菌剤の有効性については今後も動向を注視する必要があると思われた。

農林水産省が示す抗菌性物質の使用指針において、マイコプラズマによる呼吸器病、中耳炎及び乳房炎の治療には、16員環マクロライド系及びテトラサイクリン系抗菌剤が推奨されている [10]。本調査結果から、岩手県南地域に蔓延している野外株に対し、これらの薬剤はほぼ無効であることが判明した。したがって、第一選択薬にはフェニコール系抗菌剤、第二・三選択薬にはフルオロキノロン系抗菌剤及び 15員環マクロライド系抗菌剤が有効であると思われた。同じ系統の薬剤は同様の感受性傾向を示すことから、第一選

択薬と第二選択薬は異なる系統を選択することがより効果的である。

以上から、マイコプラズマの治癒率を向上させるため、また、効果が期待できない抗生剤の不必要な使用を避けるため、原因菌の検索及び感受性試験結果に基づき適切に薬剤を選択することの重要性が改めて確認された。*M. bovis* は臨床症状のない牛の上部呼吸器や肺及び乳汁中からも分離される [2]。今後はそれらの牛の鼻腔スワブ及びバルク乳を用いたモニタリング検査により *M. bovis* 感染状況及び薬剤感受性動向の継続的な把握に努めていきたい。

引用文献

- [1] Gagea MI, Bateman KG, Shanahan RA, et al. : Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves, *J Vet Diagn Invest*, 18, 29-40 (2006)
- [2] Maunsell FP, Woolums AR, Feancoz D, et al. : *Mycoplasma bovis* infections in cattle, *J Vet Intern Med*, 25, 772-783 (2011)
- [3] 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, *Applied and Environmental Microbiology*, 85, e00575-19 (2019)
- [4] Hata E, Nagai K, Murakami 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)
- [5] Hannan PCT : Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species : *Vet Res*, 31, 373-395 (2000)
- [6] 田村豊 : 動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策—特に診療獣医師の果たす役割について—, *日獣会誌*, 56, 685-691 (2003)
- [7] 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, 令和元年 (2019), 動物医薬品検査所 HP (オンライン), (https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/R1_hanbaidaka.pdf)
- [8] Gautier-Bouchardon AV, Ferré S, Le Grand D, et al. : Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France, *PLoS ONE*, 9, e87672 (2014)
- [9] CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 5th ed. CLSI document VET01S, Wayne, PA, USA.
- [10] 農林水産省経営局 : 家畜共済における抗菌性物質の使用指針, 農林水産省 HP (オンライン), (https://www.maff.go.jp/j/keiei/hoken/saigai_hosyo/s_kokuzi_tuti/pdf/h_261118_siyo_sisin.pdf)
- [11] Sulyok KM, Kreizinger Z, Wehmann E, et al. : Mutations associated with decreased susceptibility to seven antimicrobial families in field and laboratory-derived *Mycoplasma bovis* strains, *Antimicrob Agents Chemother*, 61, e01983-16 (2017)