

9. 大分県で分離された*Mycoplasma bovis*のマクロライド 及びフルオロキノロン耐性状況の調査

大分家畜保健衛生所
病鑑 磯村 美乃里

【緒言】

Mycoplasma bovis (Mb) は、子牛の呼吸器病症候群 (BRDC) など呼吸器疾患の主要な原因菌である他、肺への単独感染と考えられる死亡例や、脳・関節炎など全身に病変を形成し得る。

ワクチンが無いいためそのコントロールは抗生物質による治療が主体であるが、細胞壁が無いためβラクタム系抗生物質などは無効であり、選択薬はマクロライド (ML) 系抗生物質やキノロン系抗生物質などに限られている。ところが近年、第1選択薬のMLに対する耐性菌が世界各国で増加しており [1, 2]、益々有効な薬剤が限定されている。さらに一部の地域では、第2選択薬のフルオロキノロン (FQ) 系抗生物質に対する耐性菌の増加も指摘されている [3, 4]。以上のことから、治療に使用する抗生物質の選択には、薬剤感受性試験の結果を考慮することが重要である。

しかしMbの薬剤感受性試験には、耐性の基準が曖昧、時間がかかる等の問題点があり、薬剤感受性状況は有事に備えて予め把握しておくことが必要であると同時に、代替法による判定を検討する必要があると考えられる。

近年、人由来マイコプラズマ (*M. pneumoniae*) では薬剤耐性に関与する遺伝子の変異の有無によりその耐性状況を判定していることから、Mbでも同様の方法を採用することが有効である可能性がある。しかしMbの薬剤耐性遺伝子の変異に関する報告はまだ少なく、その有効性については明らかではない。

人や豚など由来のマイコプラズマ属菌は、23SリボソームRNA (以下23S rRNA) のドメインVの1塩基変異によりML耐性となることが指摘されている [7, 8]。一方、国内の数少ない報告によると、MbではこのドメインVの変異は殆どみられず、ドメインIIの1塩基変異G748Aが認められている [1, 9]。また海外のMbでもドメインIIの変異が主体である [2, 6, 10]。しかし、Mbでは本当にドメインIIの1塩基変異のみが原因なのか、何故、人や豚など由来のマイコプラズマ属菌と異なった位置に変異がみられるのか等は不明である。

また、第2選択薬のキノロン系の抗生物質は、菌のDNAジャイレースやトポイソメラーゼのキノロン耐性決定領域 (QRDR) に結合してその酵素活性を阻害し、細菌のDNA複製を妨げることが知られており、この部位のアミノ酸置換によりコンフォメーション変化がおこると耐性化すると考えられている。Mbについてもこの該当箇所の変異が複数報告されており [3, 4]、耐性遺伝子の変異の有無を調べればその耐性状況を把握できる可能性がある。

そこで、県内Mb野外株について、薬剤感受性試験、ML及びキノロン耐性遺伝子の解析を実施した。

【材料と方法】

薬剤感受性試験：県内で、2007年～2018年9月までの約11年間に分離された野外株のうち45株について、微量液体希釈法によるMICの測定を行った。供試株の由来の内訳は、鼻スワブ、肺など、殆ど呼吸器由来のものであった（図1）。また、Mbの基準株であるPG45についても同時に実施した。対象薬剤は、タイロシン（TS）、チルミコシン（TMS）、エンロフロキサシン（ERFX）、チアンフェニコール（TP）、リンコマイシン（LCM）、オキシテトラサイクリン（OTC）の6薬剤とした。

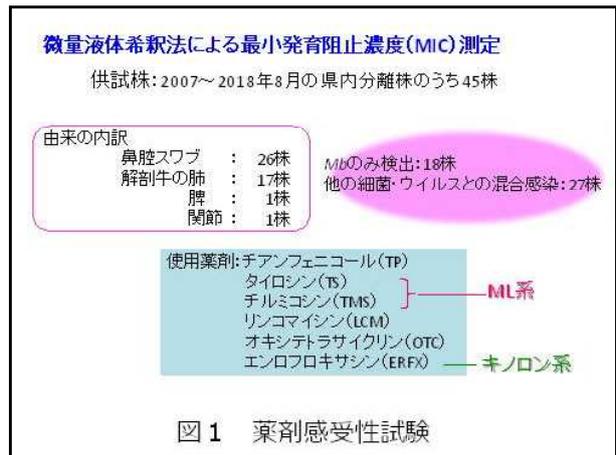


図1 薬剤感受性試験

遺伝子解析：薬剤感受性試験に用いた株のうち、ML耐性関連遺伝子（以下「耐性遺伝子」）については18株（いずれも薬剤感受性試験の結果耐性と考えられたもの）、キノロン耐性遺伝子については19株（MICが4未満のもの：7株、4以上のもの：12株）について実施した。

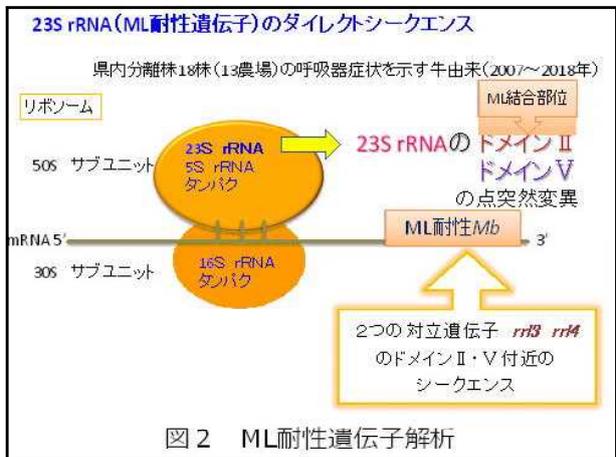


図2 ML耐性遺伝子解析

ML耐性遺伝子の解析は、Mbの23S rRNAのアリルは2つ、すなわちrr13とrr14とがあるため、それぞれについて実施した。シーケンスは、各アリルについて、ドメインII及びV付近の中心に遺伝子解析を実施した。（図2）

キノロン耐性遺伝子gyrA及びparCの解析は、gyrA、parCのQRDR付近をPCRにより増幅し、酵素のGyrA及びParCのアミノ酸配列の解析を実施した。（図3）

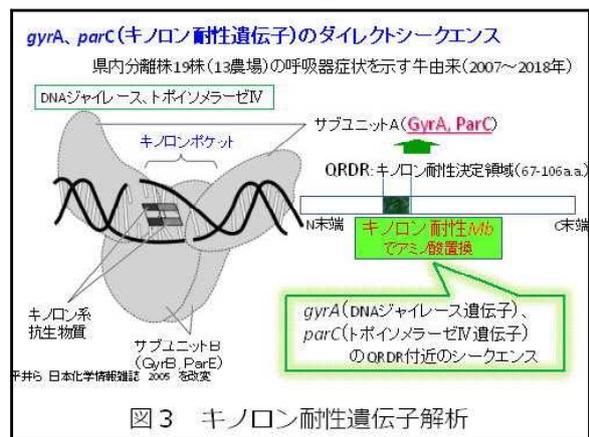


図3 キノロン耐性遺伝子解析

以上で得られたデータの解析は、データベース（BLAST ; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）に登録されているPG45の配列と比較し、変異及びアミノ酸置換の有無をMEGA6を用いて確認した。

耐性株選択試験：遺伝子解析の結果みられた変異がin vitroで再現できるかどうかを検証するため、耐性選択試験を実施した。方法は、PG45を抗生物質TS、TMS、ERFXをそれぞれ添加した液体培地で4代以上継代して得られた株（耐性誘導株）について、野外株と同様の方法で耐性遺伝子の解析を実施した。

以上で得られたデータの解析は、データベース（BLAST ; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）に登録されているPG45の配列と比較し、変異及びアミノ酸置換の有無をMEGA6を用いて確認した。

【結果】

薬剤感受性試験：TS及びTMSのMIC50はいずれもPG45のMIC値よりも7管以上大きくなっており、TSのMICはすべての株で4 μ g/mL、TMSのMICは全ての株で32 μ g/mL以上であった。

OTCとERFXのMIC50はPG45のMIC値よりも7管大となっているが、特に最近2年間とそれ以前とを比較した場合、OTCは感受性寄りにシフトしているのに対し、ERFXは耐性寄りにシフトしていた。

遺伝子解析：ML遺伝子解析の結果（表1）、すべての株でドメインIIのG748Aの1塩基変異が、両側のアレルでみられた。

また、すべての株でT1239Cの1塩基変異が片側にみられ、うち3株では両側にみられ、この時のMICは、TSでは16、TMSでは128 μ g/mL以上を示していた。

なお、PG45では変異はみられなかった。

この様に、既報と同様にG748A、既報にはないT1239Cの1塩基変異がみられた。

QRDRの解析では（表2）、MICが4以上の株の全てにおいて、GyrAにS83Fのアミノ酸置換がみられた。

ParCでは、D84G、S80Iなどがみられた。

これらのアミノ酸置換は既報と同様であったが、本調査では特に、複数のパターンがみられるParCと比べて、GyrAは特定のパターン（83番目のセリンのアミノ酸置換）がみられ、これはMIC値とも相関していた（相関係数 \approx 0.6）。

ここで、ある同一農場、A農場の、QRDR解析データを経時的にみると（表3）、2008～2009年当時にはERFX感受性であったが、2017年からはMIC値の上昇がみられ、QRDRのアミノ酸置換もみられるようになってきている。なお、この農場では、第1・2選択薬をそれまでのアンピシリンもしくはセファゾリンから、近年フロルフェニコールもしくはERFXへと変更している。このように、MICだけではなく、耐性遺伝子解析の結果にも、使用抗生物質の変更による影響が確認できた。

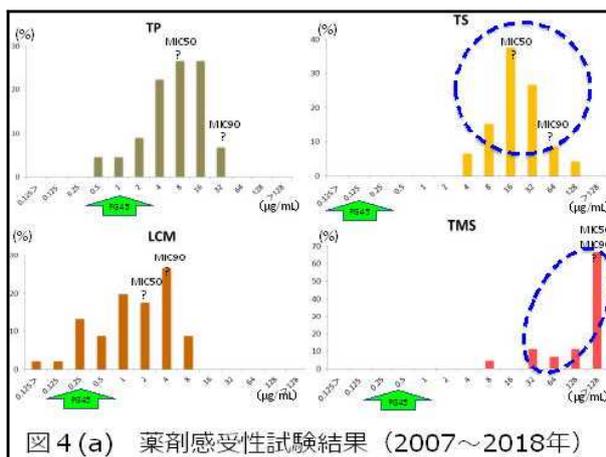


図4(a) 薬剤感受性試験結果（2007～2018年）

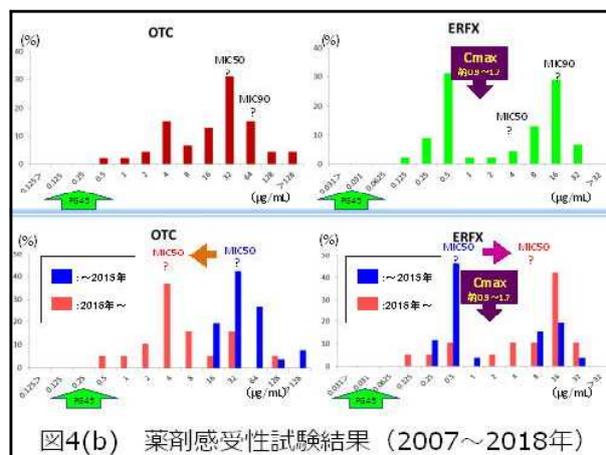


図4(b) 薬剤感受性試験結果（2007～2018年）

表1 ML耐性遺伝子解析結果

23S rRNA						株数	MIC範囲 (μ g/mL)	
rr3			rr4				TS	TMS
ドメイン II	ドメイン II-III	ドメイン V	ドメイン II	ドメイン II-III	ドメイン V			
G748A	-	-	G748A	T1239C	-	14	4~128	8~128<
G748A	T1239C	-	G748A	T1239C	-	3	16~128<	128 \leq
G748A	-	-	G748A	T1239C	C1360T	1	8	128
-	-	-	-	-	-	(PG45)	0.125	0.25

-:変異なし

耐性誘導試験 (表4) : TSではドメインVにA2063C及びA2059G/T変異が、いずれも片側アシルでみられた。TMSでは、ドメインVにA2063C変異が片側アシルにみられた。しかし、いずれでも、野外株でみられたようなドメインII・G748A変異はみられなかった。

また、ERFX耐性選択株では、GyrAにS83F、ParCにD84Gがみられ、これらは野外株でもみられたものと同様であった。

【考察】

今回の調査の結果、県内で分離されたMb野外株はすべてTS及びTMSに耐性であり、またERFXに高率に耐性であることがわかった。

TS及びTMS (ML) の耐性傾向は、大分県でも世界的な傾向と同様であると考えられた。また、ERFXに対する耐性については、6年前の大分県での調査でも指摘されていたことであり、これは国内の他県の調査と比較しても高度耐性と考えられていた[5]が、今回の調査では当時よりもさらに高度耐性となっていると考えられた。

これらMIC値の結果は耐性遺伝子解析の結果と関連していた。

OTCについては、1980年代を中心に全国的に高度耐性が指摘されていた。今回の調査でもMIC価が大きく耐性傾向がある可能性が考えられたが、近年改善傾向にあるとも考えられた。今後もOTCの使用状況を注視し、

耐性状況の調査を継続する必要があると考えられた。既報ではOTCに関する耐性遺伝子解析の報告もみられ、ML及びキノロン耐性遺伝子と同様の解析も可能である可能性がある。今回はその検討は未実施であるが、今後の検討課題であると考えた。

ML耐性遺伝子解析の結果、県内Mb野外株ではドメインII・G748A変異を高率に認め、これは既報と同様であった。しかし、ほかにもT1239C変異を高率に認め、これは既報とは異なっていた。既報では、報告毎に変異パターンに差異が認められ、調査した国・地域によって異なっている。この原因については、流行株の遺伝子型が国によって異なっている可能性が指摘されているが、既報ではその確たる証拠は得られていない。D. Khalilらの報告[6]によると、フランスの流行株には2つのMLST型がみられ、それらの間に変異パターンの差異がみられているが、この2つの型の流行時期にはずれがあり、変異のパターンも

表2 キノロン耐性遺伝子解析結果

QRDR					
GyrA	株数	MIC範囲 (µg/mL)	ParC	株数	MIC範囲 (µg/mL)
S83F	10	4~32	S80I	3	16~32
S83Y	1	8	D84V	1	16
E87V	1	8	S80R	2	16
S83F	1	0.5	D84G	2	4
-	6	≤ 0.5	その他	13	≤ 8
-	(PG45)	0.03125	-	3	≤ 8
			-	(PG45)	0.03125

--変異なし

表3 A農場のQRDR (GyrA、ParC) 解析結果

A農場 (黒毛和種・繁殖農家、BRDC多い)

分離年	QRDRs		MIC (µg/mL)
	GyrA	ParC	ERFX
2008	-	-	0.5
2009	-	-	0.5
2017	S83F	D84G	4
2017	S83F	-	8
2018	S83F	D84G	4
PG45	-	-	0.03125

--変異なし

表4 耐性選択株の遺伝子解析

薬剤	株No	23S rRNA				QRDRs	
		rrl3		rrl4		GyrA	ParC
		ドメインII-III	ドメインV	ドメインII-III	ドメインV		
① TS	1	-	A2063C	-	-	NT	NT
	2	-	A2059T	G1409A	-	NT	NT
	3	G1376C	A2059G	-	-	NT	NT
	4	-	A2059G	-	-	NT	NT
② TMS	5	-	A2063C	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	NT	NT
③ ERFX	7	-	-	-	-	S83F	D84G

- : 変異なし, NT: 実施せず

同一パターンに収束する傾向があることから、研究者はMLST型以外の要因が関与している可能性を指摘している。このことから、変異のパターンには、遺伝子型など分子レベルの要因よりも、国・地域差の関与が大きい可能性があると考えた。

キノロン耐性遺伝子の解析結果から、県内Mb野外株ではGyrAの83番目のセリンのアミノ酸置換（殆どがフェニルアラニンへの置換）がみられ、MIC値との相関もみられた。既報ではGyrAよりもParCのアミノ酸置換の方が耐性獲得に重要である、という考察が多くみられるが、大分県の株ではこれとは異なった結果となった。このことから、MLと同様に、FQの変異パターンにも国・地域による差異などの要因が関与している可能性が考えられた。

以上のことから、MIC値のみならず、耐性遺伝子解析は薬剤耐性状況を把握するのに有用であると考えた。

耐性選択試験では、TSとTMSではドメインV・A2063Cの1塩基変異がみられ、TSのドメインV・A2059G/Tがみられた。このようなドメインVの変異は、人や豚など由来のマイコプラズマ属菌でよくみられることが知られているが、今回の結果から、宿主の種特異的ではない可能性が考えられた。Mbの野外株におけるドメインVの変異の報告は国内ではごくわずかであるが、海外では報告がみられ、国によっては高率に認められる。今後の薬剤耐性菌対策のためにもこの原因究明は必要であると考えられる。またERFXでは、GyrAにS83F、ParCにD84Gがみられ、これらは野外株でみられた変異と同様であった。このことから、*in vitro*で野外株の変異が再現され、野外株の変異はERFXによって生じた変異であることが裏付けられた。

【結 論】

県内Mb野外株は、ML系のTS及びTMS、FQ系のERFXに耐性であった。なお、その他（OTC、TP）は近年耐性率が低下していることから、現状では大きな問題はないと考えられた。

また遺伝子解析により、今回はじめて県内Mb株の変異の実態が明らかとなった。既報と同様の変異のほか、既報とは異なる変異を高率に認め、これは県内分離株の特徴と考えられた。

これらの変異は、MIC値と相関していた。

また、ERFX耐性野外株には、GyrAにS83Fアミノ酸置換が高率にみられ、これは既報と同様で、耐性誘導株でも同様の置換が再現できた。

以上のことから、MIC値と、耐性遺伝子の変異のデータを収集・分析することにより薬剤耐性の程度を推測可能となり、より詳細・正確に耐性状況を把握することが期待できると考える。

また、耐性遺伝子の変異の位置には、国・地域的な傾向があると考えられ、県内株の定期的なモニタリングが必要と考えられる。

【参考文献】

- [1] Toyotaka Sato et al. *Mycoplasma bovis* isolates from dairy calves in Japan have less susceptibility than a reference strain to all approved macrolides associated with a point mutation (G748A) combined with multiple species-speci

- fic nucleotide alterations in 23S rRNA. *Microbiol Immunol.* (61), 215-224 2017
- [2] Uri Lerner et al. Acquired resistance to the 16-membered macrolides tylosin and tilmicosin by *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology.* (168), 365-371. 2014
- [3] I. Lysnyansky et al. Rapid detection of a point mutation in the *parC* gene associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy.* (53), 4911-4914 2009
- [4] Toyotaka Sato et al. Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves. *J. Vet. Med. Sci.* (75), 1063-1065. 2013
- [5] 吉田 (山本) 史子ら. 大分県内で過去5年間に分離された *Mycoplasma bovis* の疫学的解析. 平成24年度 大分県家畜保健衛生所並びに畜産関係業績発表会集録 2012
- [6] Dima Khalil et al. Monitoring the decrease in susceptibility to ribosomal RNAs targeting antimicrobials and its molecular basis in clinical *mycoplasma bovis* isolates over time. *Microbial Drug Resistance.* (23), 799-811. 2017
- [7] 河合 泰宏ら. マクロライド耐性マイコプラズマ感染症. *臨床と微生物.* (40), 253-258 2013
- [8] Hideki Kobayashi et al. Macrolides and lincomycin susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* and variable mutation of domain II and V in 23S Ribosomal RNA. (67), 795-800. 2005
- [9] 小嶋 暢ら. *Mycoplasma bovis* のマクロライド耐性機構の解明と簡易検出法の開発. *日本獣医師会雑誌.* (71), 267-268 2018
- [10] Gautier-Bouchardon AV et al. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol Spectr.* (6), doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030 2018