

Mycoplasma hyorhinisにおける薬剤感受性の変化

誌名	日本豚病研究会報
ISSN	09143017
著者名	小林,秀樹 秦,英司 江口,正志 吉井,雅晃 宮崎,綾子 池田,秀利 勝田,賢 伊藤,博哉 久保,正法 播谷,亮 山本,孝史
発行元	日本豚病研究会
巻/号	44号
掲載ページ	p. 23-27
発行年月	2004年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Mycoplasma hyorhinis における薬剤感受性の変化 ー最近の10年ー

小林秀樹、秦 英司、江口正志、吉井雅晃、宮崎綾子、池田秀利、勝田 賢、伊藤博哉、
久保正法、播谷 亮、山本孝史 (動物衛生研究所)

Kobayashi, H., Hata E., Eguchi, M., Yoshii, M., Miyazaki, A., Ikeda, H., Katsuta, K., Itoh, H., Kubo, M., Haritani, M., Yamamoto, K. (2003). A shift of antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from piglets in the last decade. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 44, 23-27.

Mycoplasma hyorhinis は若齢豚に関節炎、離乳豚に多発性漿膜炎を惹起する豚を固有宿主とした病原性マイコプラズマである。一次肺炎起病性はほとんど無く、あっても非常に軽微な間質性肺炎が認められる程度であるが、PRRSV や肺炎の一次病原微生物との多重感染によって肺炎を増悪する因子としての意義が大きい。近年における我々の調査では、コンベ農場における離乳豚からの本マイコプラズマの分離率は鼻腔で約80%、肺炎病巣からは60%程度である。*M. hyorhinis* はPRRSV の感染等によって分離成績が左右されるが、全ての農場に蔓延していると考えられ、育成豚の肺炎病変から最も頻繁に分離される細菌である。また、*M. hyorhinis* は豚を固有宿主とする6種のマイコプラズマの中で最も簡単に分離可能で、飼料添加物や化学療法剤が最も多く使用される育成期に分離のピークにあることから豚マイコプラズマの抗菌薬剤感受性のガイドポストに相応しいと思われる。

マイコプラズマ感染症対策にはマクロライド (ML) 系抗生物質が第一次選択剤として使用されている。しかしながら、我々は1991-94年に国内の発育不良豚から分離した *M. hyorhinis* や *M. hyosynoviae* の約10%がML系薬剤の耐性株であったことを報告した^{1,2)}。以後10年間、国内における豚由来マイコプラズマの薬剤感受性試験の報告はない。今回我々は *M. hyorhinis* 新鮮分離株の抗菌薬剤に対する感受性試験を実施するとともに、得られたML耐性株の性状について一部の知見が得られたので報告する。

材料および方法

東北、関東、東海、九州地域の20農場から概ね1~4ヶ月齢の呼吸器症状を呈する子豚113頭を供試した(表1)。剖検で得られた肺炎部(肉眼所見で肺炎が確認されない場合は前葉尖部)のムチン寒天培地へのスタンプ培養(5%炭酸ガス、37℃、68時間)でマイ

表1 *M. hyorhinis* の分離状況とリンコマイシン(LCM)耐性株の割合

農場	地域	供試子豚数	<i>M. hyorhinis</i> 分離頭数*	LCM耐性 <i>M. hyorhinis</i> 分離頭
1	関東	5	3	2
2	関東	5	2	2
3	関東	6	6	3
4	関東	6	4	0
5	関東	6	6	4
6	関東	6	4	0
7	関東	7	6	1
8	関東	3	0	0
9	関東	4	0	0
10	関東	6	4	0
11	関東	3	3	3
12	九州	7	7	2
13	九州	6	3	0
14	九州	3	0	0
15	東海	9	6	3
16	東海	10	4	4
17	東北	5	3	0
18	東北	6	6	2
19	東北	5	2	2
20	東北	5	2	0
計		113	71(62.8%)	28(24.8%, 39.4%)

*肺からの分離成績。*M. hyorhinis*が 10^4 CFU/g未満は陰性と定義。
1株/検体を感受性試験に供試。

コプラズマ様コロニーが有意に確認されたもの(>100 CFU /平板培地)について2~3コロニーをクローニングした。クローニング株は代謝阻止試験あるいは *M. hyorhinis*-PCR3)により *M. hyorhinis* の同定をした。さらに全ての肺材料を乳剤とし *M. hyorhinis*-PCR を実施した。この肺乳剤をテンプレートとしたPCRで陽性であったもの、あるいはクローニング株が *M. hyorhinis* と同定された検体を *M. hyorhinis* 陽性検体とした。

薬剤感受性試験は *M. hyorhinis* 株が分離された検体から1株を抽出して実施した。供試薬剤は表2に示した9薬剤で、日本化学療法学会に準拠し、寒天培地希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。これらの株の成績は1991-94年分離株(子豚肺炎由来107株)のそれと比較した。

M. hyorhinis BTS7株(基準株)の耐性値上昇試験は0.4~50μg/mlの各濃度でリンコマイシン(LCM)を含むムチン液体培地と同寒天培地を準備し、はじめに液体培養して発育の認められた最大発育許容濃度(MAC)の培養液を同濃度にLCMを含有する平板に継代、これを第一代とし、1コロニーを同濃度から2、4、8倍濃度の液体培地と平板に塗抹した。液体培地

における MAC のカラムを -80℃ 保存 (第二代) し、MAC 平板から更に 1 コロニーを選出し前回と同様に繰り返した。LCM を 50 µg/ml に含む平板に発育が認められた時点で耐性値上昇試験を中止した。この試験はタイロシン (TS) を供試して同様に実施した。この耐性 BTS7 株と各地域から 1 株ずつ抽出した 4 株の ML 耐性野外分離株は継代培養による耐性喪失試験に供試した。この試験は薬剤の含まれないムチン液体培地と同寒天培地を準備し、平板塗抹して出現した 1 コロニーを液体培地と平板に塗抹した。液体培地に発育したものを -80℃ 保存し (第一代)、平板上の 1 コロニーは再度液体培地 (第二代) と平板に塗抹、これを 40 代まで繰り返した。-80℃ に保存しておいた各継代後の液体培養液は 200 倍希釈して、その 5 µl を接種菌とした LCM および TS に対する感受性試験を実施した。

結果

M. hyorhinis は供試した 113 頭のうち 71 頭 (62.8%) の肺から分離された。また、薬剤感受性試験に供試した 71 株のうち 28 株が LCM に耐性であった (表 1)。各薬剤の感受性試験結果を 1991-94 年分離株のそれと併せて MIC 分布表で示した (表 2)。LCM 耐性 28 株のうち 26 株は TS やジョサマイシン等の ML 系薬剤に交差耐性を示していた (表 3)。1991-94 年分離株 (保存株)

表 2 *M. hyorhinis* 1991~1994 年分離株と 2002~2003 年分離株の薬剤感受性比較

薬剤	分離年	最小発育阻止濃度 (µg/ml) - 寒天平板希釈法 -											MIC ₅₀	MIC ₉₀		
		0.1	0.2	0.4	0.8	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100			>100	
タイロシン	1991-94		10*	31*	6				8	2	1			28	1.58	>100
	2002-03			38	9	1									0.8	50
ジョサマイシン	1991-94		8	26	58	26				10	14			0.8	50	
	2002-03		1	17	24	4			2	10	14			0.8	50	
キタサマイシン	1991-94		1	5	5	40	53	11	3		4	7	15	1.58	3.13	
	2002-03		1	5	5	32	2							1.58	30	
リンコマイシン	1991-94				95	32					11			0.8	50	
	2002-03				11	32	1						28	1.58	>100	
ジロキサリン	1991-94			44	64									0.8	0.8	
	2002-03		2	45	24	1								0.4	0.8	
チアムリン	1991-94		57	24	7									0.2	0.4	
	2002-03		7	22	21	21								0.8	1.58	
チアムニール	1991-94				5	18	28	9						3.13	3.13	
	2002-03					5	23	26	6					3.13	6.25	
オキシテトラサイクリン	1991-94		18	20	15	25	25	14						1.58	6.25	
	2002-03		17	26	88									0.2	0.4	
カナマイシン	1991-94		1	50	53	11	3							1.58	6.25	
	2002-03		1	2	10	33	15	6	5					3.13	25	

* 菌株数
* 菌株数 BTS7 の最小発育阻止濃度
参照: Antimicrob. Agent Chemother. 40:1030 (1996)
J. Vet. Med. Sci. 58:1107 (1996)

表 3 リンコマイシン耐性 28 菌株の各種マクロライド抗生物質感受性

マクロライド 抗生物質	最小発育阻止濃度 (µg/ml)								
	0.4	0.8	1.56	3.12	6.25	25	50	100	>100
(リンコマイシン)									28 ^a
タイロシン		2							26
ジョサマイシン	1	1			2	10	14		
キタサマイシン		1	1		4	7	15		
スピラマイシン				2					26

^a 菌株数

と近年分離株 (新鮮株) の薬剤感受性成績を比較して明らかとなったこととして、①新鮮株は ML 耐性株の割合が増加し (約 4 倍)、分離株の約 40% を占めた。②新鮮株の ML 耐性値は、TS、LCM に対し顕著な上昇がみられた。③反対に、新鮮株のオキシテトラサイクリン (OTC) に対する感受性は上昇した。④新鮮株のカナマイシンに対する感受性は低下した。

M. hyorhinis 株はエンロフロキサシン (ERFX) とチアムリン (TML) に対し最も高い感受性を示し、新鮮株と保存株の感受性の差異は認められなかった。

M. hyorhinis BTS7 株を供試した LCM での耐性値上昇試験は、継代回数で 5 代目以降急速に耐性化がみとめられた。この耐性は抗菌剤非含有培地での継代数 14 回まで安定していた (図 1)。一方、BTS7 株を TS で耐性誘導したのも、初期導入継代回数が LCM のそれより若干多くかかったが LCM とほぼ同様に耐性化した。LCM で誘導したものは TS やその他の ML 薬剤にも耐性を示し、逆に TS で誘導したものは LCM とその他の ML 薬剤にも耐性を示した。LCM で誘導した BTS7 耐性株の耐性喪失試験 (図 1) の成績は ML 耐性保存株のそれと酷似していたので後者の成績を参考のため再掲した (原図: Antimicrob. Agent Chemother. 40:1030, 図 2)。しかしながら、4 株の ML 耐性新鮮株はいずれも 40 回の継代培養によっても耐性

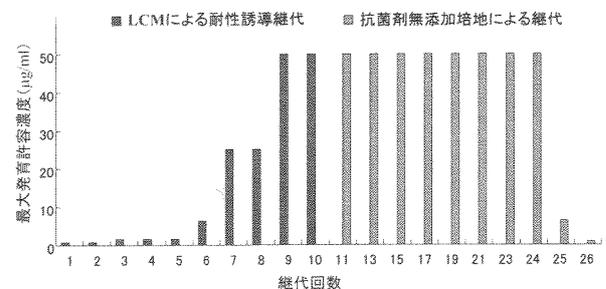


図 1 BTS7 株の LCM による耐性誘導と耐性化株の抗菌剤無添加培地での各継代後における LCM に対する最大発育許容濃度の変化

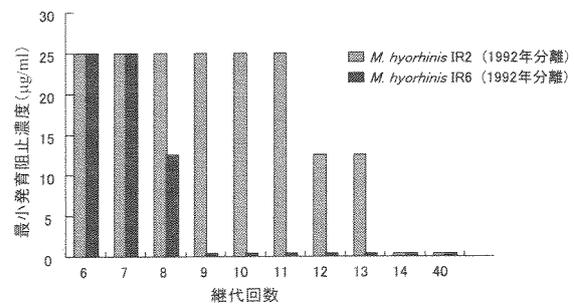


図 2 抗菌剤無添加培地での各継代後における *M. hyorhinis* マクロライド耐性株のキタサマイシンに対する最小発育阻止濃度の変化

参照: Antimicrob. Agent Chemother. 40:1030 (1996)
J. Vet. Med. Sci. 58:1107 (1996)

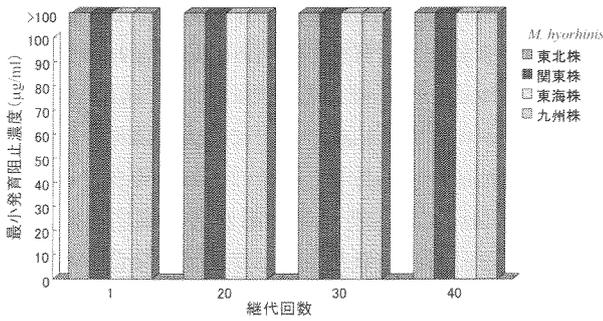


図3 抗菌剤無添加培地での各継代後における*M. hyorhinis*マクロライド耐性株(2002年分離)のタイロシンに対する最小発育阻止濃度の変化

を失わなかった (図3)。

考察

豚由来マイコプラズマの野外分離 ML 耐性株の報告は *M. hyorhinis* と *M. hyosynoviae* について著者らが最初に報告した¹²⁾。その後、デンマーク⁴⁾や英国⁵⁾等でもこの2菌種についてのML耐性株の分離報告がある。一方、アメリカ合衆国においても同様の試験がなされたが、*M. hyorhinis* の ML 耐性株は分離されなかった⁶⁾。これらの報告には興味深い点かふたつあり、そのひとつは *M. hyosynoviae* 株についてデンマークの ML 耐性株は全て LCM に感受性であったことである。今回の成績には *M. hyosynoviae* について触れていないが、我々の分離した株はいずれも ML 薬剤と LCM には交差耐性が認められていた²⁾。今回の試験から、LCM に耐性で ML 感受性を示す株を2株見いだした。これらの事実から、マイコプラズマにおける LCM や ML 耐性の機構は複数存在することが示唆された。もうひとつは合衆国の成績で、*M. hyorhinis* 分離株のエリスロマイシン (EM) における MIC₉₀ が16µg/ml であったことである。保存株の EM に対する MIC は全て >100µg/ml であった¹²⁾ため、今回の試験では EM を除外したが、合衆国の成績は全体的にどの薬剤も感受性が高いものであった。ただし、我々の成績や各国の報告をみる限り、EM は薬剤の直接効果 (in vitro 成績) として *M. hyopneumoniae* には有効かもしれないが上述2菌種には効果がないと断定できる。

マイコプラズマにおける ML 耐性機構は1995年末、Lucier らによってはじめて報告された⁷⁾。それは *M. pneumoniae* (ヒトのマイコプラズマ肺炎起因菌) の EM に対する耐性機構であり、23Sリボソーム RNA のポイントミューテーションであった。EM は14員環 ML であり、今回供試した ML は全て16員環 ML である。耐性機構は同じかどうか分からないが現在調査中

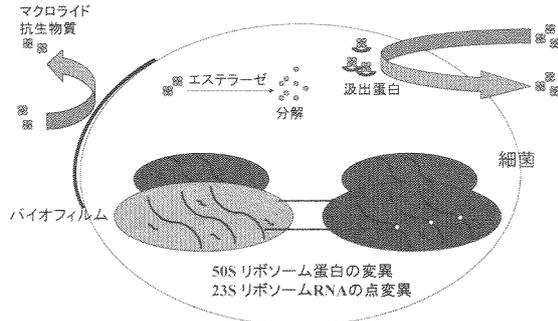


図4 細菌におけるマクロライド耐性の機序

である。その他、大腸菌や肺炎球菌などの ML 耐性機構で判明しているものに、バイオフィルムの形成、ML 汲み出し蛋白 (菌体内薬剤排泄の促進) やエリスロマイシン分解酵素の産生等があるので参考のため図4としてまとめてみた。いずれの耐性機構も検討していくつもりであるが、ML 耐性新鮮株から感受性株を作出しないことには比較のしようがない。今も継代を遂行しているところである。一方、本稿に手技や結果を記述していないが、ML 耐性保存株のうち IR2 株と IR2 株を ML 感受性に戻した IRS2 株について、二次元蛋白分離したものを図5に示した。この分離結果から、タンパク質①は耐性時にはおそらくリン酸化があったものと推測される。菌体のどのタンパク質がリン酸化されているのかは不明であるが、耐性に関わるのならおそらくリボソームタンパク質の可能性が大きい。今後、この蛋白のアミノ酸解析による同定を実施する予定である。

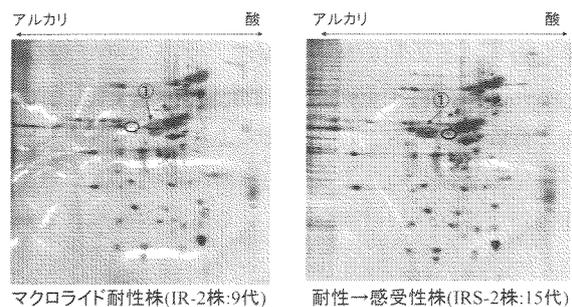


図5 1992年分離マクロライド耐性IR-2株とIR-2株から作出したマクロライド感受性IRS-2株の二次元蛋白解析の比較

ML 以外の薬剤については、KM に対する低感受性傾向が確認されたことは意外であった。このことについて明確な理由はないが、KM やそれ以外のアミノグリコシド系薬剤から誘導されているのかもしれない。もうひとつ意外だったのは OTC に対する感受性が高くなっていたことである。保存株の OTC に対する MIC 分布は0.2~6.25µg/ml と広く、まさに耐性化傾

向にあるかのようであった。これらの株が分離される以前の1986年には Yamamoto らが豚の *M. hyopneumoniae* から⁸⁾、続いて Uchida らが鶏の *M. gallisepticum* と *M. synoviae* から相次いでテトラサイクリン系薬剤に対し中～高等度耐性を示す株の分離報告をしている。にもかかわらず新鮮株は OTC に高い感受性を示したことは、現在では TC 系薬剤の使用量が減少しているとみるしかないだろう。これは数年前に認可されたピリドンカルボン酸系抗菌薬（ニューキノロン）の使用量と関係があると著者は考えている。

耐性値上昇試験では BTS7 株を10継代以内で LCM に対する MAC で50 μ g/ml までに上昇させることができた。この値は導入初期の100倍以上であった。同様の試験はヒトのマイコプラズマや鶏マイコプラズマで実施されているがせいぜい10倍程度であり、菌種によっては10継代程度では全く上昇しないということから、*M. hyorhinis* は in vitro において、LCM や ML 系薬剤に対し比較的耐性を生じやすい菌種なのかもしれない。また、引き続き実施した BTS7 株の耐性喪失試験では耐性保存株のそれとほぼ同様な耐性喪失過程を示したことから、保存株が分離された頃が ML 耐性 *M. hyorhinis* の出現初期であったのかもしれない。新鮮株のうち LCM と ML に耐性を示す株が40%を占めること、耐性も高度化し、いってみれば頑固な耐性となっていることもその理由にならないだろうか。いずれにしても現在分離される *M. hyorhinis* が以前のものより頑固な ML 耐性を示したことは、抗菌剤を中心とした衛生対策に大きな影響を与えることに間違いない。すなわち、その他の豚由来マイコプラズマである *M. hyosynoviae* や *M. hyopneumoniae* についても同様である可能性があること、更に、より耐性を獲得しやすい腸球菌をはじめとする腸内細菌、黄色ブドウ球菌や連鎖球菌等は一層耐性化していると考えらるべきであろう。

今回の薬剤感受性試験の成績から *M. hyorhinis* には ERFX と TML が高い感受性を示し、その成績は保存株でのそれと全く変化がなかった。TML ははもともとマイコプラズマの特効薬（豚赤痢菌、ヘモフィルスにも有効）として使用され、抗菌スペクトルも狭いため対象疾病が限定的である。これに対し ERFX はマイコプラズマに限らずたいの細菌感染症に有効である。動物薬で ERFX を代表とするニューキノロン系薬剤はもともと抗ガン剤から出発したもので、細胞の DNA ジャイレースや DNA トポイソメラーゼの酵

素活性を阻害し、DNA 複製を抑制することで細胞の増殖抑制をする。細菌感染症対策に応用され、当初は耐性菌をつくらない薬剤とうたわれた。結果として、開発したドイツでは1980年後半には大腸菌やサルモネラ等で耐性菌が検出されたのをはじめ、現在では多種の細菌において低感受性菌や耐性菌が報告されるに至っている。耐性機構は主として細菌の染色体上に存在する DNA ジャイレース遺伝子やトポイソメラーゼ IV 遺伝子の点変異あるいは細菌の膜に存在する薬剤能動排出機構の機能亢進によるとされている。豚の病原性マイコプラズマではおそらくこのような機構を獲得しにくいのもかもしれない。一方、腸内細菌は比較的速度やかに獲得が起こるようである。各種感染症対策に使用した ERFX は病原性大腸菌やサルモネラ、肺炎起因細菌に影響を与えるのである。著者は今夏ベトナムにおいて豚浮腫病起因菌の性状調査を実施したが、実に浮腫病起因大腸菌株の7割が ERFX に対し低感受性あるいは耐性であった。現在 ERFX は万能薬かもしれないが、切り札でもある。将来を考えた適切な使用を望みたい。

今後の方針として、上述の ML 耐性化機構を追究するために、ML 耐性新鮮株から感受性化株を作出して比較試験を実施することはもとより、同一農場から分離された ML 耐性株と非耐性株間の Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) 比較、異所由来 ML 耐性株間の PFGE 比較による疫学的な解析を行うことを考えている。また、*M. hyosynoviae* や *M. hyopneumoniae* の薬剤感受性動態の把握と得られた *M. hyorhinis* 研究の知見をこれらのマイコプラズマに応用していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Kobayashi, H. et al. (1996) Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets. Antimicrob. Agent Chemother., 40: 1030-1032.
- 2) Kobayashi, H. et al. (1996) In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyosynoviae* and *M. hyorhinis* to antimicrobial agents. J. Vet. Med. Sci., 58: 1107-1111.
- 3) Kobayashi, H. et al. (1996) *Mycoplasma hyorhinis* infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). J. Vet. Med. Sci. 58: 109-113.
- 4) Aarestrup, F. M. and Friis, N. F. (1998) Antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma*

- hyosynoviae* isolated from pigs during 1968 to 1971 and during 1995 and 1996. Vet. Microbiol., 61: 33-39.
- 5) Hannan P. C. et al. (1997) In vitro susceptibilities of recent field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to valnemulin (Econor), tiamulin and enrofloxacin and in vitro development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Res. Vet. Sci., 63: 157-160.
 - 6) Wu, C. C. et al. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. Vet. Microbiol., 76: 25-30.
 - 7) Lucier, T. S. et al. (1995) Transition mutation in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob. Agent Chemother., 39: 2770-2773.
 - 8) Yamamoto, K. et al. (1986) In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antibiotics. Jpn. J. Vet. Sci., 48: 1-5.
 - 9) Uchida, K. et al. (1986) Drug sensitivity in vitro of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* strains isolated from commercial broiler and layer chickens. J. Jpn. J. Vet. Med. Assoc., 39: 644-647.