

# Mycoplasma bovisの薬剤感受性とマクロライド耐性株の 23SリボゾームRNAドメインV領域の解析

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	小池, 新平 宇佐美, 佳秀
巻/号	64巻1号
掲載ページ	p. 45-49
発行年月	2011年1月

# *Mycoplasma bovis* の薬剤感受性とマクロライド耐性株の 23S リボゾーム RNA ドメイン V 領域の解析

小池新平<sup>†</sup> 宇佐美佳秀

栃木県県央家畜保健衛生所（〒321-0905 宇都宮市平出工業団地6-8）

（2010年6月7日受付・2010年9月27日受理）

## 要 約

牛呼吸器病由来 *Mycoplasma bovis* (M. b) 52株の薬剤感受性とマクロライド (ML) 耐性機構にかかわる 23S リボゾーム RNA (rRNA) のドメイン V 領域を調べた。タイロシン (TS) 耐性は、3株 (5.8%) に認め、うち2株 (3.8%) はリンコマイシン (LCM) 耐性を示した。チルミコシンの最小発育阻止濃度 (MIC) は  $\leq 0.1 \sim > 100 \mu\text{g/ml}$  で、24株 (46.2%) が高い MIC ( $> 100 \mu\text{g/ml}$ ) を示した。エンロフロキサシンは2株 (3.8%)、カナマイシンは1株 (1.9%) に耐性を認めた。オキシテトラサイクリン、チアンフェニコール、フロルフェニコールおよびチアムリンに耐性は認めなかった。TS-LCM 耐性の2株のうちの1株で、23S rRNA のドメイン V 領域の2058位にアデニン (A) → グアニン (G) 置換が確認された。いっぽう、残りの ML 耐性または低感受性株には当該領域の変異は認めなかった。したがって、M. b は 23S rRNA のドメイン V 領域の変異に加えさらに他の耐性機構により ML 耐性を獲得している可能性が示唆された。

——キーワード：薬剤感受性、23S rRNA ドメイン V 領域、マクロライド耐性、*Mycoplasma bovis*。

----- 日獣会誌 64, 45~49 (2011)

*Mycoplasma bovis* (M. b) は、牛呼吸器病症候群 (Bovine Respiratory Disease Complex : BRDC) の原因病原体の一つにあげられるとともに、乳房炎や中耳炎、関節炎の起因菌 [1] として、畜産農家に大きな経済被害をもたらすことが知られている。M. b のコントロールは、感染防御ワクチンがない [2] ことから、抗生物質による治療がその損失を最小限にする有効な方法となっている。しかし、国内における M. b の薬剤感受性を調査した報告は少なく、その実態はあまり明らかにされていない。

近年、人や豚のマイコプラズマにおいてマクロライド (ML) 耐性株が出現し、その耐性機構の一つとして 23S リボゾーム RNA (rRNA) のドメイン V 領域での変異が関与することが明らかになっている [3-5]。しかし、M. b についてはその耐性機構に関わる報告はない。

そこで今回、栃木県内で分離された牛呼吸器病由来 M. b の薬剤感受性試験を実施し、これまで報告されている国内外の成績と比較した。また、本調査において ML 耐性 M. b を用いて耐性機構にかかわる 23S rRNA

のドメイン V 領域の変異についても解析したので報告する。

## 材料および方法

**供試株：**2005~2008年の4年間に栃木県内の40農場において病性鑑定を実施した呼吸器病罹患牛あるいはと畜場出荷牛の肺病変または鼻腔拭い液から分離した M. b 52株 (乳用牛由来8株、肉用牛由来44株) を供試した。各個体からの分離株数は1株とした。

**M. b の分離培養と同定：**滅菌リン酸緩衝液で10%乳剤を作製し2,000rpm 5分間遠心した上清を Hayflick の液体培地に添加後、37℃、3~5日間好気培養し、その増菌液を Hayflick の寒天培地に接種し、37℃、10% CO<sub>2</sub> 下で3~5日間培養することを繰り返しながら継代とクローニングを実施した。クローニング株の同定は PCR [6] で実施した。

**薬剤感受性試験：**動物用抗菌剤研究会報に準じた微量液体希釈法 [7] により最小発育阻止濃度 (MIC :  $\mu\text{g/ml}$ ) を求めた。供試薬剤は、タイロシン (TS)、チルミ

<sup>†</sup> 連絡責任者：小池新平 (栃木県県央家畜保健衛生所)

〒329-2713 那須塩原市緑2-12-14

☎0287-36-0314 FAX 0287-37-4825

E-mail : koikes02@pref.tochigi.lg.jp

表 1 Mycoplasma bovis 52株の薬剤感受性

薬剤 <sup>1)</sup>	最小発育阻止濃度 (MIC : $\mu\text{g/ml}$ )													MIC <sub>50</sub> <sup>3)</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>4)</sup>	BP	耐性率
	$\leq 0.1$	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100				
TS	1		* <sup>2)</sup>			1	2	3	14	20	8		3	25	50	100	5.8
TMS	1		*				2	2	5	6	7	5	24	100	100<	-	-
LCM	1		1*	5	31	7	5							0.78	3.13	25	3.8
OTC				*				1	2	23	26			25	50	-	-
KM							3	2*	18	24	4		1	25	25	100	1.9
TP							1	10*	40	1				12.5	12.5	-	-
FF							3*	22	26	1				12.5	12.5	-	-
TML	24		22	4*	2									0.2	0.39	-	-
ERFX			1*	15	20	14			1		1			0.78	1.56	3.13	3.8

1) TS : タイロシン TMS : チルミコシン LCM : リンコマイシン OTC : オキシテトラサイクリン KM : カナマイシン  
 TP : チアンフェニコール FF : フロルフェニコール TML : チアムリン ERFX : エンロフロキサシン  
 2) \* : 基準株 PG45株 3) 50%の菌株の発育を阻止したMIC 4) 90%の菌株の発育を阻止したMIC

表 2 Mycoplasma bovis の 23S rRNA ドメイン V 領域の解析

株名	23S rDNA シーケンス (2052~2066位)	薬剤 (MIC : $\mu\text{g/ml}$ )	変異
No. 3	AGACGAAAAGACCCC	TS, TMS, LCM (>100)	無
No.39	AGACGAGAAGACCCC	TS, TMS, LCM (>100)	有
No.16	AGACGAAAAGACCCC	TS (50), TMS (>100)	無
No.25	AGACGAAAAGACCCC	TS (50), TMS (>100)	無
No.22	AGACGAAAAGACCCC	TS (50), TMS (25)	無
No.31	AGACGAAAAGACCCC	TS (50), TMS (25)	無
PG45 (基準株)	AGACGAAAAGACCCC	TS (0.2), TMS (0.2)	無

コシン (TMS), リンコマイシン (LCM), オキシテトラサイクリン (OTC), カナマイシン (KM), チアンフェニコール (TP), フロルフェニコール (FF), チアムリン (TML) およびエンロフロキサシン (ERFX) の 9 薬剤を使用した。薬剤対照株として基準株の PG45 株を供試した。ブレイクポイント (BP) は、MIC 分布が二峰性を示した時の中間値とした。国内外の報告と今回得られた成績とは 90% の菌株の発育を阻止する MIC<sub>90</sub> で比較した。

**23S rRNA のドメイン V 領域の解析 :** M. b の 23S rRNA のドメイン V は既知のマイコプラズマと異属細菌の 23S rRNA の配列を比較し保存性の高い部位を検索し、プライマー領域 (23SCom-F : GTA ACTAT AACGGTCCTAAG および 23SCom-R : GTTACTCT TTAGGAGGCGAC) を設定して PCR を実施した。PCR 条件は、94℃ 3分 → 94℃ 1分 → 57℃ 1分 → 72℃ 1分を 30 サイクル行った。PCR 産物をアガロースゲルで泳動後、特異バンドを切り出して抽出精製し、塩基配列を決定した。すべてのサンプルから得られた PCR 産物の塩基配列をインターネット上のフリープログラム Molecular

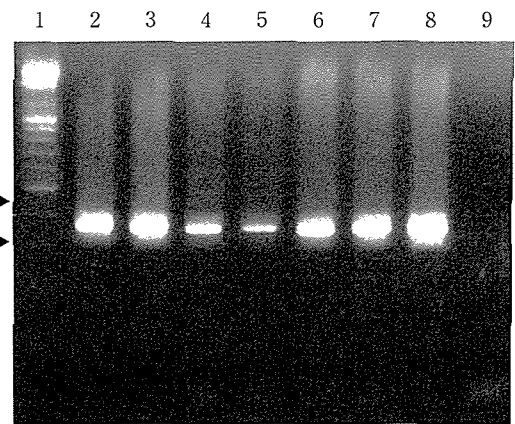


図 1 M. bovis の 23S rRNA 遺伝子の PCR による増幅  
 1 : 100bp DNA ladder, 2 : No.3, 3 : No.39,  
 4 : No.16, 5 : No.25, 6 : No.22, 7 : No.31,  
 8 : PG45 株 (基準株), 9 : 陰性コントロール

evolutionary genetics analysis (MEGA) 4 (<http://www.megasoftware.net/index.html>) を使用して比較した。

### 成 績

調査した薬剤に対する耐性率は、TS で 5.8% (3 株)、LCM および ERFX で 3.8% (2 株)、KM で 1.9% (1 株) であった。ML 系薬剤である TS および TMS の MIC は広範囲に分布した ( $\leq 0.1 \sim > 100 \mu\text{g/ml}$ )。TMS では、52 株中 24 株 (46.2%) が高い MIC (> 100  $\mu\text{g/ml}$ ) を示した。TS 耐性 3 株中 2 株が LCM に対する耐性を示し (MIC : > 100  $\mu\text{g/ml}$ )、その他の株は LCM に対して感受性 (MIC :  $\leq 0.1 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ ) であった。OTC の MIC は 6.25 ~ 50  $\mu\text{g/ml}$  に一峰性に分布し、52 株中 26 株 (50.0%) が 50  $\mu\text{g/ml}$  と比較的 low 感受性を示した。KM 耐性は 1 株で認められ、KM の MIC は 3.13 ~ > 100  $\mu\text{g/ml}$  であった。TP および FF の MIC は 3.13 ~ 25  $\mu\text{g/ml}$  に一峰性に分布した。また、調

査した株は、TMLに対してすべての薬剤の中で最も高い感受性 (MIC :  $\leq 0.1 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$ ) を示した。2株はERFXに対して耐性 (それぞれMIC 12.5と50  $\mu\text{g/ml}$ ) を示したが、多くの株は感受性 (MIC :  $0.2 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ ) であった。(表1)。

23S rRNAのドメインV領域のPCRによる増幅では表2に示すML系薬剤 (TSおよびTMS) とLCMで高いMICを示した6株 (No. 3, 16, 22, 25, 31および39株) にも基準株PG45株と同サイズ (370bp) の増幅産物が得られた (図1)。

これらの株についてPCRおよびシーケンスを実施しML感受性株である基準株の塩基配列と比較した結果、TSおよびLCMの2剤耐性株の2株中1株に1カ所の塩基の置換 (No. 39 : 2058位のアデニン (A) がグアニン (G) に置換 : A2058G) が確認された。しかしながら、それ以外のML系薬剤でMICの高かった株では変異が認められなかった (表2)。

## 考 察

本県で分離された牛呼吸器病由来M. bにおいて、TS, LCM, KMおよびERFXに耐性が認められた。TSのMIC<sub>90</sub>は、2003年に行われたHiroseら [8] の報告に比べて、2008年に行った加藤ら [9] の報告と同様、上昇していた。TMSについては国内での成績がなかったが、海外報告 [1, 10, 11] では、TMSのMIC<sub>90</sub>は高く、本県と同様の傾向を示した。ERFXのMIC<sub>90</sub>は、これまでの国内 [8, 9] および海外 [1, 11, 12] の報告よりも高い結果であった。M. bの薬剤感受性に関する国内での報告は、Hiroseら [8] および加藤ら [9] による2つの報告だけと少ないことから、M. bの耐性化に地域差があるのか今後さらに調査が必要と考えられた。

著者ら [13] が以前に実施した牛呼吸器病原因菌である *Mannheimia haemolytica* および *Pasteurella multocida* の薬剤感受性調査では、両菌種でナリジクス酸の耐性率が高く、臨床現場における薬剤使用状況調査でもフルオロキノロン (FQ) 系薬剤の使用頻度が高いことを報告した。今回の調査で、M. bにおいて、FQ耐性のM. bが2株認められたことから、今後も本菌のFQ耐性の動向に注意を払う必要がある。

生方 [14] はML系薬剤の広範な使用は、いずれ耐性マイコプラズマを選択することは予測されていると述べている。人由来の *M. pneumoniae* (M. p) は呼吸器感染症の重要な原因菌でありながら、分離培養は診断に役立たないため、ほとんど実施されなくなっている [14]。しかし、2002年以降、小児肺炎由来M. pにおけるML耐性が急速に増加し [15]、Matsuokaら [4] も国内3地域で耐性株が存在することを報告しており、ML耐性M. pが国内の人医療で拡大していることを示唆してい

る。畜産領域においても牛呼吸器病の発症予防にML系薬剤の一つであるTMSは高い臨床効果を有することが報告されており [16]、臨床現場では広く使用されていると考えられる。本調査において、本県ではML耐性M. bの分布が初めて明らかとなり、今回認められたML耐性または低感受性株はすべて肉用牛由来株であった。今回、供試したM. bは52株中44株が肉用牛由来であり、著者ら [13] が調査した報告でもML系薬剤は、肉用牛では使用率が高い傾向にありBRDCの予防目的に本薬剤が投与され今回の結果に影響している可能性が考えられた。今後は乳用牛由来株を増やして用途別で薬剤感受性に差があるかなどの疫学的調査をする必要があると思われる。

人のM. pのML耐性株では、ドメインV領域の2063または2064位の塩基がAからGに置換することが報告されている [4]。いっぽう、今回の調査ではM. bにML耐性が確認されたにもかかわらず、ドメインV領域の変異を認めるものが1検体しか見出せなかった。M. bのゲノムは部分的に解析されているが、全長は解析されていない。Kobayashiら [5] の *M. hyorhinis* のドメインV領域の塩基配列と比較した結果、その1株のM. bは2058位の塩基がAからGに置換されていることが確認された。成田 [17] は、現在までのマイコプラズマのML耐性機構としては23S rRNAドメインV領域の点突然変異のみが発見されていると述べている。しかし、今回の成績では、ドメインV領域以外の部位での塩基の置換が耐性に影響している可能性も考えられ、変異部位によってML耐性化の程度が異なるか調査する必要があると考えられた。

また、今回の調査からML系薬剤と作用機序が類似するといわれるLCMとの交差耐性が少ないことが示された。同様の成績として、豚の *M. hyosynoviae* (M. hs) 株でML耐性株がすべてLCMに感受性であったことが報告 [18] されている。このことは、M. bやM. hsでは他のML耐性マイコプラズマとは異なる耐性機序を有する可能性が示唆され、今後のML耐性機構を詳細に解明するための資料になり得ると考えられた。

ML系薬剤はブドウ球菌、レンサ球菌などのグラム陽性菌、淋菌およびコレラ菌などのグラム陰性菌およびマイコプラズマに対して抗菌活性を示し、これらに対する有効な薬剤とされている [19]。しかし、今回の調査で、M. bにおいてML耐性M. bの顕著な分布が示されたことから、生産現場や診療獣医師へ情報提供と注意喚起をする必要があると思われる。また、薬剤感受性調査は、野外における薬剤耐性M. bの疫学を把握する上で重要であり、今後も定期的な調査が必要である。なお、M. bのML耐性機序の解析については、今後、感受性株で耐性誘導された株のドメインV領域の解析やリポゾーム蛋

白の構造の違いについても検討をする予定である。

稿を終えるにあたり、23S rRNA ドメイン V 領域の解析に協力していただいた(独)農研機構動物衛生研究所の小林秀樹先生、和歌山県紀南家畜保健衛生所東牟婁支所の後藤洋人先生、と畜場での肺炎材料収集に協力していただいた栃木県北食肉衛生検査所、宇都宮市食肉衛生検査所の関係各位に深謝する。

### 引用文献

- [1] Rosenbusch RF, Kinyon Jm, Apley M, Funk ND, Smith S, Hoffman LJ : In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003, *J Vet Diagn Invest*, 17, 436-441 (2005)
- [2] 小林秀樹 : 牛のマイコプラズマ肺炎, 動物の感染症, 小沼 操他編, 第2版, 139, 近代出版, 東京 (2006)
- [3] Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umet-su M, Kenri T, Sasaki Y, Arakawa Y, Sasaki T : Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro, *Microbiol Immunol*, 45, 617-620 (2001)
- [4] Matsuoka M, Narita M, Okazaki N, Ohya H, Yamazaki T, Ouchi K, Suzuki I, Andoh T, Kenri T, Sasaki Y, Horino A, Shintani M, Arakawa Y, Sasaki T : Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan, *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 4624-4630 (2004)
- [5] Kobayashi H, Nakajima H, Shimizu Y, Eguchi M, Hata E, Yamamoto K : Macrolide and lincomycin susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* and variable mutation of domain II and V in 23S ribosomal RNA, *J Vet Med Sci*, 67, 795-800 (2005)
- [6] Chavez Gonzalez YR, Bascunana CR, Bolske G, Mattsson JG, Molina CF : In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR, *Vet Microbiol*, 47, 183-190 (1995)
- [7] 動物用抗菌剤研究会 : 牛呼吸器病病原菌 (マイコプラズマ) の薬剤感受性試験法, 動物抗菌会報, 18, 53-54 (1997)
- [8] Hirose H, Kobayashi H, Ito N, Kawasaki Y, Zako M, Kotani K, Ogawa H, Sato H : Isolation of *Mycoplasmas* from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public health*, 50, 347-351 (2003)
- [9] 加藤敏英, 山本高根, 小形芳美, 漆山芳郎, 荻野祥樹, 齋藤博水 : 薬剤感受性に基づいた牛呼吸器感染症治療プログラムの臨床効果, *日獣会誌*, 61, 294-298 (2008)
- [10] Ayling RD, Baker SE, Peek ML, Simon AJ, Nicholas RAJ : Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin, and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*, *Vet Rec*, 146, 745-747 (2000)
- [11] Gerchman I, Levisohn S, Mikula I, Lysnyansky I : In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle, *Vet Microbiol*, 137, 268-275 (2009)
- [12] Ter Laak EA, Noordergraaf JH, Verschure MH : Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma disper*, *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents in vitro, *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 317-321 (1993)
- [13] 小池新平, 井上恭一, 米山州二, 市川 優, 田島和彦 : 栃木県で過去16年間に分離された牛呼吸器病原因菌の薬剤感受性調査, *日獣会誌*, 62, 533-537 (2009)
- [14] 生方公子 : 急速に進行する市中呼吸器感染症原因菌における耐性化の本質, *日本臨床微生物学雑誌*, 18, 75-84 (2008)
- [15] Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, Chiba N, Takayanagi R, Matsubara K, Nakayama E, Sunakawa K, Ubukata K : Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumoniae, *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 348-350 (2008)
- [16] 加藤敏英, 齋藤雅一, 庄司和明, 板垣昌志 : *Pasteurella multocida* および *Mycoplasma* が関与した導入牛の呼吸器病に対するエンロフロキサシンとチルミコシンの予防効果, *日獣会誌*, 56, 7-11 (2003)
- [17] 成田光生 : 薬剤耐性マイコプラズマの現状と今後の展望, *モダンメディア*, 53, 297-306 (2007)
- [18] Aarestrup FM, Friis NF : Antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma hyosynoviae* isolated from pigs during 1968 to 1971 and during 1995 and 1996, *Vet Microbiol*, 61, 33-39 (1998)
- [19] 砂塚敏明 : マクロライド系薬の新作用と創薬, *日化療会誌*, 52, 367-370 (2004)

Antimicrobial Susceptibility of *Mycoplasma bovis* and Analyses of Domain V  
in 23S Ribosomal RNA of Macrolide-Resistant Strains

Shinpei KOIKE<sup>\*†</sup> and Yoshihide USAMI

<sup>\*</sup> *Tochigi Prefecture Kenou Livestock Hygiene Service Center, 6-8 Hiraidekougyoudanchi,  
Utsunomiya, 321-0905, Japan*

SUMMARY

We examined the antimicrobial susceptibilities of 52 *Mycoplasma bovis* isolated from cattle with respiratory disease and the nucleotide sequence of domain V in 23S ribosomal RNA (rRNA) associated with macrolide (ML) resistance. Resistance to tylosin (TS) was found in three isolates (5.8%). Of the three isolates, two (3.8%) were resistant to lincomycin (LCM). The minimum inhibitory concentration (MIC) of tilmicosin ranged from  $\leq 0.1$  to  $> 100 \mu\text{g/ml}$ ; 24 isolates exhibited a high MIC of tilmicosin ( $> 100 \mu\text{g/ml}$ ). Resistance to enrofloxacin and kanamycin were found in two and one isolates, respectively. All the isolates were susceptible to oxytetracycline, thiamphenicol, florfenicol, and tiamulin. Nucleotide sequencing revealed that one of the two TS-LCM-resistant strains had an A to G mutation at position 2058 in domain V of 23S rRNA. However, no mutations were detected in the domains of other ML-resistant or low-susceptible strains. These findings suggests that *M. bovis* may acquire ML resistance through alternative resistant mechanisms, in addition to mutations in domain V 23S rRNA.

— Key words : antimicrobial susceptibility, domain V in 23S ribosomal RNA, macrolide resistance, *Mycoplasma bovis*.

† Correspondence to : Shinpei KOIKE (Tochigi Prefecture Kenou Livestock Hygiene Service Center)

6-8 Hiraidekougyoudanchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan

TEL 0287-36-0314 FAX 0287-37-4825 E-mail : koikes02@pref.tochigi.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 45 ~ 49 (2011)

日本産業動物獣医学会誌編集委員会委員

【編集委員】

- |                             |                            |
|-----------------------------|----------------------------|
| ◎澤田 勉 (大阪府立大学名誉教授)          | 川村 清市 (北里大学名誉教授)           |
| ○明石 博臣 (東京大学大学院農学生命科学研究科教授) | 関崎 勉 (東京大学大学院農学生命科学研究科教授)  |
| 佐藤 繁 (岩手大学農学部教授)            | 月瀬 東 (日本大学生物資源科学部教授)       |
| 田口 清 (酪農学園大学獣医学部教授)         | 遠矢 幸伸 (日本大学生物資源科学部教授)      |
| 八木 行雄 (動物衛生研究所研究管理監)        | 中山 裕之 (東京大学大学院農学生命科学研究科教授) |
| 稲葉 睦 (北海道大学大学院獣医学研究科教授)     | 森友 靖生 (東海大学阿蘇校舎農学部教授)      |
| 今井 壯一 (日本獣医生命科学大学獣医学部教授)    | (◎委員長, ○副委員長)              |
| 梅村 孝司 (北海道大学大学院獣医学研究科教授)    |                            |

『\* 投稿を希望される方は, 日本獣医師会学会学術誌投稿規程 (第63巻第12号961頁) 及び日本獣医師会学会学術誌投稿の手引き (第63巻第12号965頁) をご参照ください』