

## 7 *Mycoplasma bovis* の薬剤感受性とフルオロキノロン低感受性株の点突然変異の解析

県央家畜保健衛生所

田野實洋輔、湯澤裕史

はじめに

*Mycoplasma bovis*(Mb)は、牛呼吸器病症候群(BRDC)のほか、乳房炎、中耳炎及び関節炎など様々な牛疾病の原因となる。これらの疾病は短期間にまん延し、難治性症例が多く認められていることから、生産現場における経済的被害は極めて大きい。また、Mbに対する効果的なワクチンは国内で実用化されておらず、対策は感染牛の隔離・とう汰及び抗菌剤による治療が主体となっている [1, 2]。薬剤感受性試験には寒天平板希釈法、微量液体希釈法及びディスク法があるが、臨床現場では労力及び経済性の観点から主にディスク法が用いられている [3]。しかし、Mbはディスク法では薬剤感受性を適切に判定できず、当県家畜保健衛生所においても課題となっている。

国内において、1999年以降、16員環マクロライド系およびテトラサイクリン系抗菌剤に対して低感受性を示す野外株が広く浸潤していることが報告されている。さらに、フルオロキノロン系抗菌剤に対する低感受性株の出現も散見されている。これらの低感受性化には、標的遺伝子に生じた点突然変異によるアミノ酸置換（非同義変異）が関与していることが明らかとなっており、その検出法も報告されている [4, 5]。

抗菌剤の選択には地域における薬剤感受性動向の把握が不可欠であるが、県内におけるMbの薬剤感受性状況に関する報告は乏しい。そこ

で本調査では、県内分離株の薬剤感受性の経年変化及びフルオロキノロン系低感受性化に関与する点突然変異の解析を行うとともに、県内産業動物臨床獣医師の抗菌剤使用実態との関連性を調査した。

材料及び方法

### 1 供試菌株

2005～2008年(前期)及び2018～2024年(後期)の計11年間に栃木県内のと場出荷牛の肺病変並びに病性鑑定実施牛の肺病変・鼻腔拭い液から分離された57農場81株(前期32農場44株、後期25農場37株)を供試した。

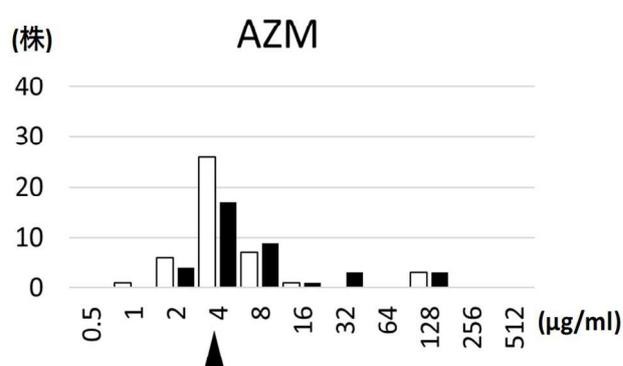
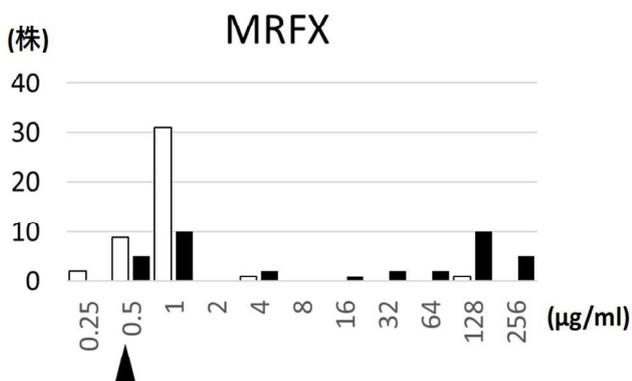
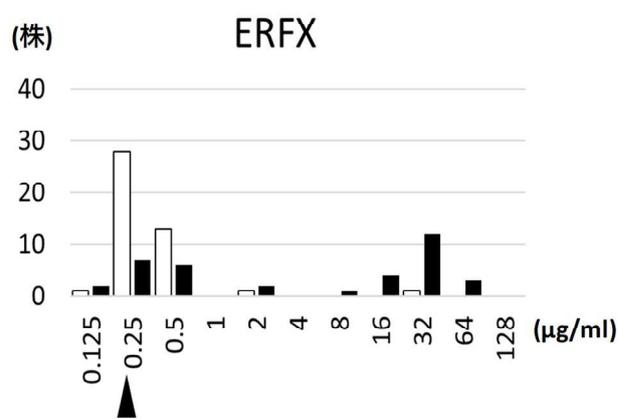
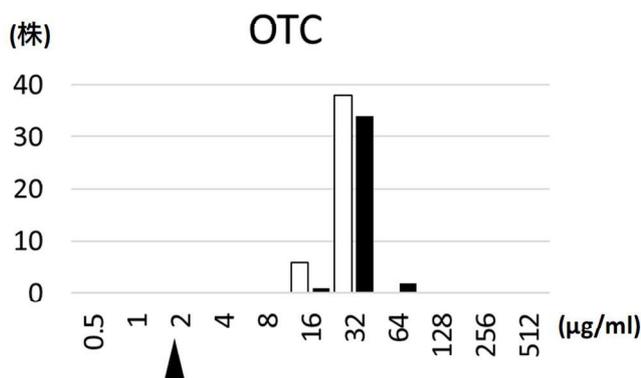
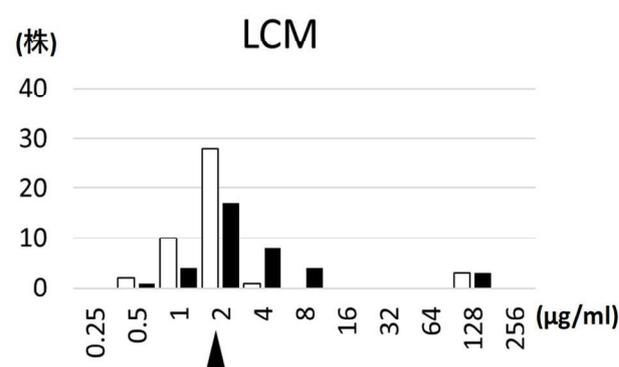
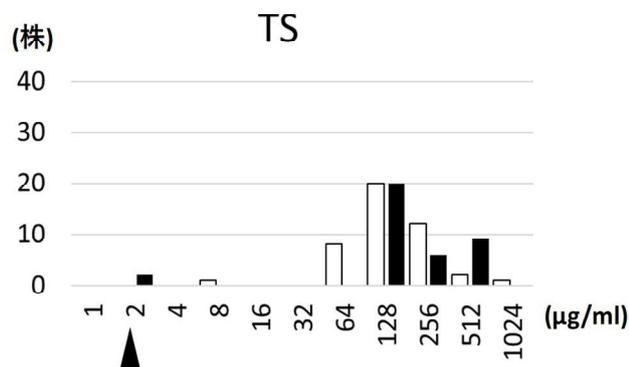
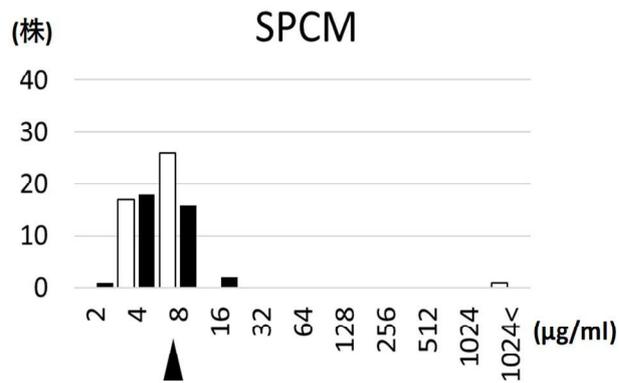
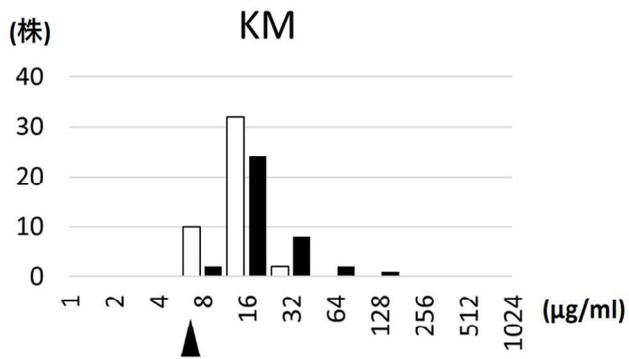
### 2 薬剤感受性試験

寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度(MIC:  $\mu\text{g/ml}$ )を測定した [6]。供試薬剤は、タイロシン(TS)、アジスロマイシン(AZM)、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)、スペクチノマイシン(SPCM)、フロルフェニコール(FF)、チアムリン(TML)、バルネムリン(VNL)、エンロフロキサシン(ERFX)、マルボフロキサシン(MBFX)の11薬剤とした。それぞれのMIC分布、MIC<sub>50</sub>及びMIC<sub>90</sub>について前期及び後期を比較し、Mb基準株(PG45)のMICを指標として低感受性を判定した。

### 3 点突然変異の解析

既報 [3] に従い、フルオロキノロン系抗菌剤の低感受性に関与する *gyrA* 及び *parC* の QRDR 領域のシーケンス解析を全81株で実施した。





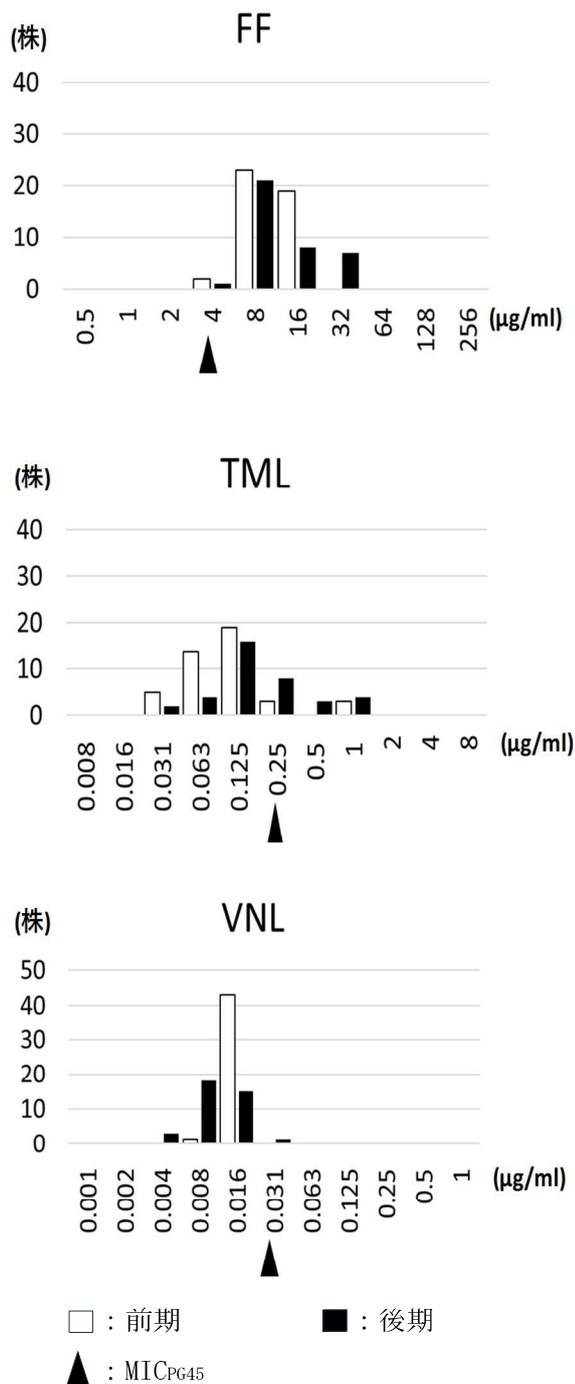


図1 抗菌剤ごとのMIC分布

## 2 点突然変異の解析

Mb の点突然変異の解析結果を図2に示した。変異が認められなかった36株は、ERFXのMICが0.125~0.5μg/ml、MBFXが0.25~1μg/mlの範囲であった。*gyrA* または *parC* の片方のみで変異を認めた24株 (ERFX: 0.25~2μg/ml、MBFX:

1~4μg/ml) は、一部に変異なし株と重複するMICを示したものの、変異なしが認められなかった群と比較して有意に感受性が低下していた ( $P < 0.0001$ )。*gyrA* および *parC* 両方で変異を認めた21株 (ERFX:  $\geq 8\mu\text{g/ml}$ 、MBFX:  $\geq 16\mu\text{g/ml}$ ) は、他の2群よりも有意に感受性の低下が認められた ( $P < 0.0001$ )。

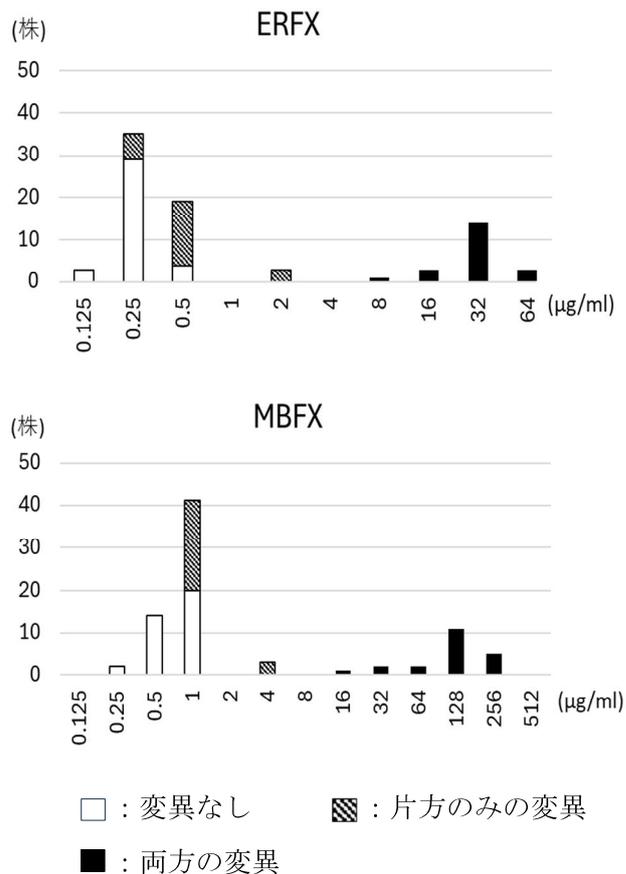


図2 変異か所別におけるMIC分布

## 3 抗菌剤の使用実態調査

アンケートは、43名 (回答率 70.5%) から回答を得た (図3)。

### (1) 呼吸器症状に使用する抗菌剤

哺乳牛に対して使用する抗菌剤について、第一次選択薬では、チアンフェニコール系 (44.2%) が最も多く、次いで、ペニシリン系 (30.2%)、テトラサイクリン系 (7.0%) であった。

第二次選択薬では、フルオロキノロン系(53.5%)が過半数を占め、次いで、チアンフェニコール系(18.6%)、第三世代セフェム系及び16員環マクロライド系(7.0%)であった。第三次選択薬では、フルオロキノロン系(27.9%)が最も多く、次いで、15員環マクロライド系(16.3%)、第三世代セフェム系及びチアンフェニコール系(7.0%)であった。育成牛においても哺乳牛と同様の傾向を示し、第一次選択薬では、チアンフェニコール系(46.5%)が最も多く、次いで、ペニシリン系(34.9%)、テトラサイクリン系(4.7%)であった。第二次選択薬では、フルオロキノロン系(48.8%)が最も多く、次いで、チアンフェニコール系(23.3%)、第三世代セフェム系(7.0%)であった。第三次選択薬では、フルオロキノロン系(32.6%)が最も多く、次いで、15員環マクロライド系及び第三世代セフェム系(9.3%)、チアンフェニコール系(4.7%)であった。

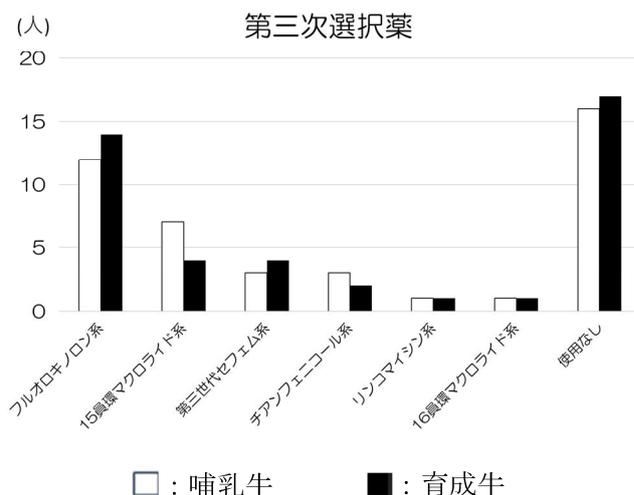
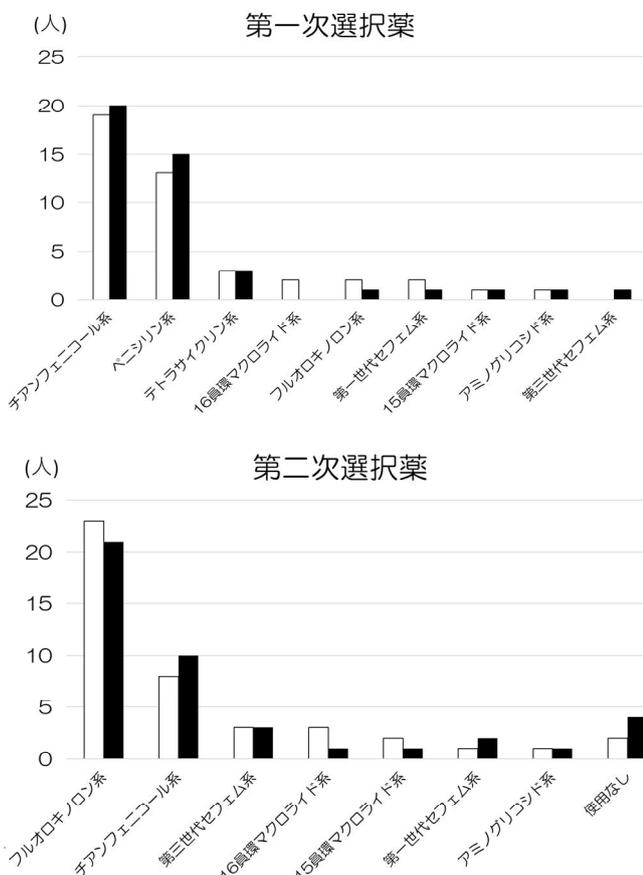


図3 県内抗菌剤使用状況

(2) 薬剤感受性試験結果の活用状況

「いつも活用している」が6.3%、「時々活用している」が43.9%、「活用したことがない」が48.8%であった。

まとめ及び考察

県内におけるMbの薬剤感受性状況として、16員環マクロライド系及びテトラサイクリン系抗菌剤は、前期及び後期ともにMIC分布が基準株より高値側に分布しており、継続して低感受性傾向で推移していることが示唆された。一方、フルオロキノロン系抗菌剤では、後期においてMIC50及びMIC90の上昇が認められ、さらにMIC分布が明確な二峰性を示したことから、顕著に低感受性化していることが明らかとなった。その他の抗菌剤においては、明らかな低感受性化は認められなかった。これらの結果は国内の既報[3]と概ね一致していた。

フルオロキノロン系における点突然変異の解析では、*gyrA*または*parC*のQRDR領域変異はMIC上昇と有意に関連し、特に両領域の変異は低感受性がより顕著であったことから、

点突然変異解析は薬剤耐性を早期かつ正確に把握する上で有用な手法であると考えられた。

農林水産省の指針では、マイコプラズマ感染症の治療に対して16員環マクロライド系およびテトラサイクリン系の選択が推奨されている [7]。しかし本調査から、県内の野外株に対してはこれらの有効性が極めて低いという実態が判明した。このことから地域における感受性動向把握の重要性が再確認された。

アンケート結果から、チアンフェニコール系が第一次選択薬として最も多く使用されているという県内の現状が明らかとなったが、このことは臨床獣医師が16員環マクロライド系等での効果が不十分と認識した上での適切な選択であると言える。一方で、第二次・第三次選択薬としてフルオロキノロン系が多用されていることが明らかとなったが、このことは本薬剤の顕著な低感受性を招いていると考えられた。また、薬剤感受性試験結果を活用した抗菌剤の選択をしているという意見は少なく、現状としては、経験に依存していると考えられる。このことは、今後さらなる耐性化と治癒率低下を招く恐れがあると考えられた。今後のMb治療の対応としては、現時点で低感受性を示す野外株が少ない15員環マクロライド系を適切な選択薬に位置付けるなどの提案が有効と思われた。

以上のことから、Mb感染症の治癒率向上と耐性化抑制のためには、本調査結果を農場および産業動物臨床獣医師へ共有し、本菌の薬剤感受性動向を継続的に周知することが重要である。加えて、今後は他系統の薬剤感受性低下に関連する遺伝子解析も実施して、薬剤感受性を正確に把握することで、より適切な治療薬選択の一助としていきたい。

## 謝辞

Mbの薬剤感受性試験並びに薬剤感受性低下に関する点突然変異の検出のご助言をいただいた、国立研究開発法人農研機構動物衛生研究部門細菌グループ秦英司先生に深謝致します。

## 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] 農林水産省：牛呼吸器病 (BRDC) における抗菌剤治療ガイドブック 改訂第2版, 166-168, 174-180 (2016)
- [4] 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)
- [5] Narita M. 2013. Diagnosis, treatment and prevention of infectious diseases. Topics: I. Countermeasures against epidemic infectious diseases:

4. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. Nihon Naika Gakkai Zasshi 102:2823-2830 (In Japanese)

[6] Hannan PCT : Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species : Vet Res, 31, 373-395 (2000)

[7] 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