

# 牛・豚由来マイコプラズマのマクロライド耐性機構と耐性株の現状

小林秀樹

(独)農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所 (〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5)

## 1. はじめに

マイコプラズマは単純な細胞構成で複雑な代謝経路をもたないため、有効薬剤が限定的である反面、薬剤耐性株も出現しにくいと考えられていた。外来の薬剤耐性に関与する遺伝子もマイコプラズマでは発現しないこともその理由のひとつである。しかしながら、マイコプラズマの薬剤耐性株は人の異型肺炎の病原体である *Mycoplasma pneumoniae* で初めて見出された。安全性と治療効果の高いマクロライド系 (MLs) のエリスロマイシン (EM) 耐性であった。この EM 耐性株は 1970～1980 年代半ばまで、国内外で散発的に報告されていたが [1-3]、その耐性機構が解明されたのは 1995 年のことである [4]。その後、人のマイコプラズマ耐性株の分離報告は少なくなったが、2000 年に日本と韓国で MLs とリンコマイシン (LCM) に交差耐性を示す *M. pneumoniae* が報告された [5]。2000 年以降この耐性を示す株の臨床分離割合は増加する傾向にあり、2005 年には 15% にも達している。これは日韓とも同様の傾向が伺われるという [5]。なお、1999 年までの国内分離保存株について再検査されたが、MLs 交差耐性株は検出されなかった。

動物由来のマイコプラズマ薬剤耐性株については日本からの報告が多い。1986 年には内田らが CM 鶏由来の *M. gallisepticum* にタイロシン耐性株を報告 [6]、Kobayashi らは 1989～1992 年に離乳豚や肥育豚から分離される *M. hyorhinis* や *M. hyosynoviae* 株、2004 年に出荷豚の MPS 病変から分離される *M. hyopneumoniae* 株が供試した全

ての MLs (14～16 員環マクロライド) と LCM に交差耐性を示すことを報告している [7-10]。牛の *M. bovis* も国内外の報告から 2000 年以降に MLs 耐性株が増加していることが明らかである。一方、MLs 以外の耐性株として、Yamamoto らがテトラサイクリン系 (TCs) 薬剤に交差耐性を示す出荷豚由来 *M. hyopneumoniae* 株 (1979～1981 年分離) について報告している [11]。また、2000 年以降、各家畜由来マイコプラズマでフルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株が報告され、耐性株の割合と MIC が上昇する傾向にある。その他、耐性機構は明らかにされていないが、アミノグリコシド系 (AGs) のカナマイシン (KM) やストレプトマイシン (SM) などに対する耐性菌株も見出されている。例えば 30 年ほど以前に、初代ウイルス分離に供試される SM を高濃度に添加した細胞培養液からマイコプラズマが分離されたこともある。

## 2. MLs などの薬理作用とマイコプラズマの薬剤耐性機構

菌体蛋白質の基となるポリペプチドは細胞内小器官であるリボソームで合成される。リボソームは 50S と 30S サブユニットが重ね餅状に結合したものであり、20 以上の蛋白と rRNA で構成される。50S サブユニットには 23S と 5S rRNA が、30S には 16S rRNA が結合している。DNA から翻訳された mRNA の遺伝情報は 30S サブユニットで読み込まれ、50S サブユニットで tRNA で搬送されたアミノ酸を繋ぎポリペプチドを合成する。この合成の要となる部位が 23S rRNA の「ドメイ

ンV」にあたる部位で、MLsやLCMはこの部分に結合してペプチド合成を阻害し静菌作用を発揮する。TCsは30Sサブユニットに結合し、mRNAからの読み込みを阻害することで最終的にペプチド合成を阻害し静菌作用を発揮する。AGsのKMは50Sと30Sサブユニットの両方に、SMは30Sのみに結合してペプチド合成を阻害し静菌作用を発揮するが、結合部位はMLsのそれとは異なる。フルオロキノロン系の薬剤作用と耐性機構については本会報31号で詳しく紹介している。なお余談になるが、真核生物(動物)もリボソームで蛋白を合成しているが、これらの抗菌剤の影響をほとんど受けない。動物のリボソームは60Sと40Sサブユニットからなり、構造的には細菌のそれと酷似しているが構造の僅かな違いが抗菌剤の結合を困難にしている。MLsやTCsの動物と原核生物のリボソームへの結合比率は1:100~1:10,000といわれる。これを選択毒性という。

マイコプラズマの薬剤耐性はこれらの薬理作用が起こらないことによって生じる。すなわち、薬剤が標的部位に結合できないということである。細菌の細胞内に薬剤が移行しない(細胞膜透過しない)、細胞内に移行してもすぐに分解されてしまう、あるいは排出されてしまう。このようなケースでは細胞内薬剤濃度が細胞外のそれより明らかに低い。細胞内濃度は高いが薬理作用が認められないケースは、薬剤分子が何らかの理由で標的部位に結合できないということである。これは標的部位の構造が変化しているためで、既に多くの細菌で解明されている。それらの機序として、rRNA(特にドメインV領域)の突然変異やメチル化、リボソーム蛋白(特にL4、L22とよばれる部位)の変異によることが知られている。このうちマイコプラズマのMLs耐性機構は23SリボソームRNAのドメインV領域の突然変異のみが、LCM耐性機構はMLs同様ドメインVに加え、ドメインII領域の突然変異も関与していることが明らかとなっている。AGs薬剤耐性は薬剤分子に修飾を加える酵素(AGリン酸転移酵素:水酸基をリン酸化してリン酸エステルにする、AGアデニル転移酵素:水酸基のアデニル化、AGアセチル転移酵素:アミノ基をアセチル化)で薬剤

を不活化することが知られるが、マイコプラズマでは実証されていない。

### 3. 牛・豚由来マイコプラズマの薬剤感受性の推移

#### (1) 豚由来 *M. hyorhinis* の薬剤感受性の変化

1991~1994年および2002~2003年に主として離乳豚の肺炎病巣部から分離した *M. hyorhinis* 株の薬剤感受性試験成績の比較を表1に示した。MLs(タイロシン、ジョサマイシンおよびキタサマイシン)とLCMに交差耐性を示す株は91~94年分離株において既に10%程度存在していた。同様の耐性株は2002~04年分離株では40%に増加していた。KMはどちらも分布は一峰性であるが、2002~04年分離株のMICは右方移動していた。KMとは対照的にオキシテトラサイクリン(OTC)は2002~04年分離株のMIC分布が91~94年分離株のそれと比して左方移動しており、OTCに対する感受性が高くなっていった。

MLsとLCMに耐性を示した全ての株は23SリボソームRNAのドメインV領域の点突然変異(A2059G)が確認されている。

#### (2) 豚由来 *M. hyosynoviae* の薬剤感受性の変化

1980~1984年および1994~1995年に出荷豚の肺炎病巣部から分離した *M. hyosynoviae* 株の薬剤感受性試験成績の比較を表2に示した。1980~1984年分離株にMLやLCMに耐性を示す株はなかったが、1994~1995年分離株ではこれらの薬剤に交差耐性を示す株が10%程度確認された。*M. hyorhinis*同様、MLsとLCMに交差耐性を示した株は23SリボソームRNAのドメインV領域の点突然変異が確認されている。OTCに対する感受性は1980~1984年分離株の方が1994~1995年分離株よりも高かった。KMを含むその他の薬剤感受性に変化はなかった。

#### (3) 豚由来 *M. hyopneumoniae* の薬剤感受性の変化

1979~1981年(OTCのみ1970年分離株の成績を追加)および2004~2005年に出荷豚の肺

表1 *M. hyorhinis* 1991～1994年分離株 (n=108) と2002～2003年分離株 (n=72) の薬剤感受性比較

薬剤	分離年	最小発育阻止濃度 (mg/L) -寒天平板希釈法-											MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	
		0.1	0.2	0.4	0.8	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100			>100
タイロシン	1991-94			10 <sup>a</sup>	<u>81</u> <sup>b</sup>	6			8	2	1			0.8	12.5
	2002-03				<u>36</u>	9	1						26	1.56	>100
ジョサマイシン	1991-94		8	26	<u>38</u>	25					10	1		0.8	50
	2002-03		1	17	<u>24</u>	4		2	10	14				0.8	50
キタサマイシン	1991-94			<u>29</u>	60	8					9	2		1.56	50
	2002-03	1	5	5	<u>33</u>	2		4	7	15				1.56	50
リンコマイシン	1991-94				<u>65</u>	<u>32</u>					11			0.8	50
	2002-03				11	<u>32</u>	1						28	1.56	>100
エンロフロキサシン	1991-94			44	<u>64</u>									0.8	0.8
	2002-03		2	45	<u>24</u>	1								0.4	0.8
チアムリン	1991-94		57	<u>44</u>	7									0.2	0.4
	2002-03		7	23	<u>21</u>	21								0.8	1.56
チアンフェニコール	1991-94				5	18	<u>76</u>	9						3.13	3.13
	2002-03					5	<u>36</u>	25	6					3.13	6.25
オキシテトラサイクリン	1991-94		19	<u>10</u>	15	25	25	14						1.56	6.25
	2002-03	17	26	<u>29</u>										0.2	0.4
カナマイシン	1991-94			1	<u>40</u>	53	11	3						1.56	6.25
	2002-03				<u>1</u>	2	10	33	15	6	5			3.13	25

<sup>a</sup> 菌株数

<sup>b</sup> アンダーライン：基準株 BTS7 の最小発育阻止濃度

表2 *M. hyosynoviae* 1980～84年分離株 (n=28) と1994～1995年分離株 (n=27) の薬剤感受性比較

薬剤	分離年	最小発育阻止濃度 (mg/L) -寒天平板希釈法-												
		0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50
タイロシン	1980-84			2	<u>14</u>	6	3	3						
	1994-95			2	7	7	5	4					2	
ジョサマイシン	1980-84					<u>15</u>	13							
	1994-95					<u>16</u>	9				1	1		
キタサマイシン	1980-84					19	9							
	1994-95					<u>15</u>	10					2		
リンコマイシン	1980-84					<u>16</u>	12							
	1994-95				1	<u>18</u>	6					2		
エンロフロキサシン	1980-84					14	<u>14</u>							
	1994-95					9	18							
チアムリン	1980-84	1	8	<u>18</u>	1									
	1994-95	1	12	<u>14</u>										
チアンフェニコール	1980-84							<u>8</u>	20					
	1994-95							7	19	1				
オキシテトラサイクリン	1980-84				1	2	<u>19</u>	6						
	1994-95							5	19	2	1			
カナマイシン	1980-84								1	4	<u>6</u>	11	6	
	1994-95								3	7	12	5		

<sup>a</sup> 菌株数

<sup>b</sup> アンダーラインは基準株 S16 株の最小発育阻止濃度

表 3 *M. hyopneumoniae* 1979～1981 年分離株 (n=55) と 2004～2005 年分離株 (n=90) の薬剤感受性比較

分離年	最小発育阻止濃度 (mg/L) : 液体培地希釈法														
	0.015	0.03	0.06	0.135	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
TS	1979-81		3	31	20	1									
	2004-05			47	30	5	1				1	4			2
JM	1979-81				29	25									
	2004-05				30	40	12	1			1	3			3
LCM	1979-81		3	26	26										
	2004-05				16	54	13								7
EM	1979-81								1	25	26	3			
	2004-05										3	45	27	7	
TML	1979-81		27	28											
	2004-05		10	44	36										
VNL	2004-05	0.002-0.004													
KM	1979-81				4		10	26	15						
	2004-05					4	12	42	23	7	2				
OTC	1970		6	4	1	2									
	1979-81				2	16	3	6	4	10					
	2004-05					10	15	39	19	7					
ERFX	2004-05			39	45	1	2	3							

1979～1981 年分離株と OTC の 1970 年分離株成績は Yamamoto ら [11] の報告を編集して組み入れた。

炎病巣部から分離した *M. hyopneumoniae* 株の薬剤感受性試験成績の比較を表 3 に示した。79～81 年分離株に ML や LCM に耐性を示す株はなかったが、2004～2005 年分離株ではこれらの薬剤に交差耐性を示す株が 8% 程度確認された。*Mycoplasma hyorhinis* や *M. hyosynoviae* 同様、MLs と LCM に交差耐性を示した株は 23S リボソーム RNA のドメイン V 領域の点突然変異が確認された。点突然変異はドメイン V のループ領域で A2058G と A2062C の 2 ヶ所で、耐性株は全て A2058G の変異を認め (図 1)、2 ヶ所同時に変異が確認された 2 株は TS に対しより高度の耐性を示した。OTC に対する感受性は 79～81 年分離株と 2004～2005 年分離株では MIC 分布に差異はなかったが、1970 年分離株のそれと比較すると明らかな右方移動が確認された。

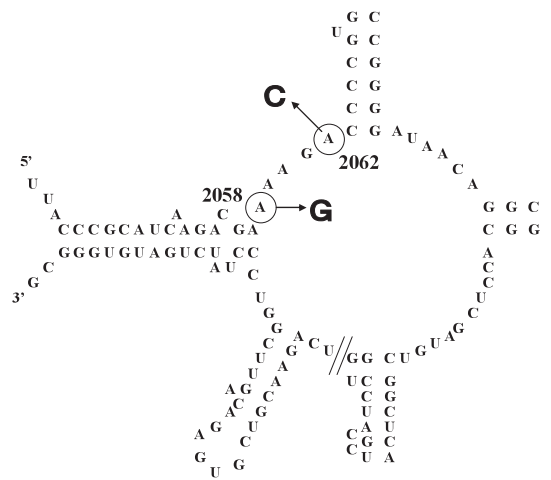


図 1 MLs 耐性 *M. hyopneumoniae* 野外分離株の 23S rRNA ドメイン V ループ領域における点突然変異と変異部位

(4) 肉用子牛由来 *M. bovis* の薬剤感受性

近年、呼吸器症状を示した肉用子牛の上部気道より分離した 64 株の *M. bovis* の薬剤感受性試験の成績について表 4 に示した。MLs の TS とチルミコシン (TMS) に対し野外分離株のほぼ全てが耐性であった。特に TMS の耐性化が著しく、MIC<sub>50</sub> で 50 mg/L、MIC<sub>70</sub> で >100 mg/L であった。

上述の豚由来 MLs 耐性マイコプラズマと異なるのは、MLs 耐性 *M. bovis* 株のほとんどが LCM に感受性であることである。MLs 耐性 *M. bovis* のうち 2 株は LCM にも耐性であったが、そのうちの 1 株については豚由来の MLs 耐性マイコプラズマと同様に 23S リボソーム RNA のドメイン V のループ領域に 1 ヶ所の点変異を確認した。一

表4 肉用子牛からの *M. bovis* 分離株 (～2010年 n=64) の薬剤感受性試験成績

	MIC, mg/L: 液体培地希釈法												
	<0.1	0.1	0.2	0.4	0.8	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
TS	1		PG45			1	2	6	17	26	8		3
TMS	1		PG45				2	2	5	6	7	5	24
LCM	1		1	8	40	7	5						2
OTC				PG45				1	4	31	29		
KM							3	2	18	24	4		1
TP							1	10	40	1			
FF							3	22	26	1			
TML	24	7	27	4	2								
ERFX			1	15	29	14			1	2	2		

アンダーラインは基準株 PG45 株の MIC を示す。

薬剤別菌株数の合計は検査に供試していない菌株があるため n=64 にならないものもある。

データ, 菌株協力  
栃木県, 兵庫県  
石川県

方, フルオロキノロン系のエンロフロキサシン (ERFX) に対しても 8% 程度の割合で耐性株が検出された。チアムリン (TML) は供試された薬剤の中で最も感受性が高い成績であった。しかしながら, 検査株数が少ないため表 4 に示していないが, バルネムリンに対する MIC は基準株も分離株も <0.1 mg/L であった。

#### 4. まとめ

*In vitro* での薬剤感受性試験において, 豚由来マイコプラズマ (*M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* および *M. hyorhinis*) は MLs と LCM に交差耐性を示す株が検出されている。耐性株の割合は菌種にもよるが約 10%～40% と推察される。これらの耐性株の割合は年々上昇する傾向がある。いずれの菌種においても耐性株の耐性機構は同一で, 23S リボソーム RNA ドメイン V のループ領域の点突然変異であった。一方, 近年子牛から分離される *M. bovis* はほぼ全ての株が MLs 耐性であることが明らかとなった。一部の株は MLs のほか LCM にも交差耐性を示し, 耐性機構も豚由来の耐性株と同様であることを確認した。しかしながら, 多くの株が MLs に耐性を示すにも拘わらず LCM に対して感受性であったこと, 23S リボソーム RNA ドメイン V のループ領域には変異がないことが豚由来の MLs 耐性マイコプラズマと異なる点である。マイコプラズマの MLs 耐性

機構は 23S リボソーム RNA ドメイン V の点変異のみが報告されており, 今後 LCM と交差を示さない MLs 耐性株の機構を解明する必要がある。フルオロキノロン耐性に関しては, *M. bovis* 株の 10% 近くが高度耐性を示した。これらの耐性株は薬剤の選択圧でより高度化し, またそれら耐性株の割合も増加すると考えられる。みだりに高度耐性株を増加させないためにも事前の薬剤感受性スクリーニングの重要性が増している。

#### 引用文献

- 1) Niitu Y, Hasegawa S, Suetake T, Kubota H, Komatsu S, Horikawa M: Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to erythromycin and other antibiotics. *J Pediatr*, 76, 438-44 (1970)
- 2) Stopler T, Gerichter CB., Branski D: Antibiotic-resistant mutants of *Mycoplasma pneumoniae*. *Isr J Med Sci*, 16, 169-173 (1980)
- 3) Taylor-Robinson D, Webster ADB, Furr PM, Asherson GL: Prolonged persistence of *Mycoplasma pneumoniae* in a patient with hypogammaglobulinaemia. *J Infect*, 2, 171-175 (1980)
- 4) Lucier TC, Heitzman K, Shi-Kau, Liu, Hu PC: Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 2770-2773 (1995)
- 5) 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)
- 6) 内田幸次, 高山公一, 原田良昭: コマーシャルのプロイラーおよび採卵鶏由来 *Mycoplasma gallisepticum* および *Mycoplasma synoviae* 株の各種薬剤に対する感受性, 日獣会誌, 39, 644-647 (1986) .
  - 7) Kobayashi H, Morozumi T, Munthali G, Mitani K, Itho I, Yamamoto K: Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets. Antimicrob Agents Chemother, 40, 1030-1032 (1996)
  - 8) Kobayashi H, Nakajima H, Shimizu Y, Eguchi M, Hata E, Yamamoto K: Macrolides 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)
  - 9) Kobayashi H, Sinmez N, Morozumi T, Mitani K, Ito N, Shiono H, Yamamoto K: *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyosynoviae* and *M. hyorhinis* to antimicrobial agents. J Vet Med Sci, 58, 1107-1111 (1996)
  - 10) 小林秀樹, 金崎未香, 秦 英司, 西森 敬, 江口正志: *Mycoplasma hyopneumoniae* の薬剤感受性試験ならびにマクロライド耐性簡易スクリーニング法の開発, 動衛研研究報告, 114: 1-7 (2008)
  - 11) Yamamoto K, Koshimizu K, Ogata M: *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antibiotics. Jpn J Vet Sci, 48: 1-5 (1986)

### Current Status and Mechanisms of Drug-resistant *Mycoplasma* strains from Pigs and Calves

Hideki KOBAYASHI

Group of Biological Products, Center for Animal Diseases Control and Prevention, National Institute of Animal Health, 3-1-5, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856

The prevalence of the macrolides (MLs)- and lincomycin (LCM)- cross resistant porcine mycoplasmas have been increasing. Especially, *Mycoplasma hyorhinis* strains in weaned pigs from Japanese herds has approximately quadrupled (10 to 40%) in the past 10 years. Other porcine mycoplasmas, such as *M. hyosynoviae* and *M. hyopneumoniae*, nearly 10% of isolates showed the same resistant patterns with that of *M. hyorhinis*. All three porcine mycoplasmas showed cross resistance to MLs and LCM, showed a transition of A to G or A to C at domain V region in 23S rRNA. On the other hand, almost all *M. bovis* strains isolated from beef calves with respiratory syndrome showed resistance to MLs. A few *M. bovis* strains had a point mutation in the same region with those of porcine mycoplasma strains and showed resistance also to LCM. However, the remaining MLs- resistant strains were susceptible to LCM. No differences were detected in the domain V region between MLs-resistant and PG45 (type strain, susceptible to MLs and LCM) strains.

### 討 論 (座長: 江口正志, 畜安研)

質問 (藤倉孝夫, 元家畜衛生試験場)

- ①マイコプラズマ肺炎はどのように治療予防しているか。
- ②テトラサイクリンは今でも有効なのか。

答 (小林秀樹)

- ①一番大切なのは環境衛生である。またワクチンが効果的であり、薬剤も使用している。薬剤の種類は他にどのような微生物が蔓延しているかにもよ

るが、マクロライド系、リンコマイシンあるいは、フルオロキノロン、チアムリンを使っているところもある。

②非常に難しい問題である。豚に対してはテトラサイクリンを治療薬として使用するのであれば有効なのかもしれないが、現在の結果を見る限りでは牛では難しいと考えられる。しかし、豚においても使用すれば耐性化が進む。30年くらい前というのは突然変異を含めてテトラサイクリンに対する耐性がまだなかったもので、その状態でテトラサイクリンに耐性を持った最初の個体が増やしていかなければ有効であるが、現在はMICの値が下がっていてもテトラサイクリンを使用すると分解する遺伝子が残っているので、すぐに選択圧がかかって耐性化が進むと思われる。

質問（藤倉孝夫，元家畜衛生試験場）

薬剤を使用した養豚からSPF豚への変換はなされていないのか。

答（浅井鉄夫，動薬検）

数字自体は極端には増えていない。割合が増えすぎると商品価値が下がる。SPF化という形だけではなく病気が非常に少ない種豚をも流通させている。現在は多くの種豚場で衛生状態がかなりよくなってきているので、以前と比較しても病気の少ないものが流通していると考えられる。

質問（藤倉孝夫，元家畜衛生試験場）

① *M. hyopneumoniae* を検出するのは容易であるのか。

② *M. hyorhinis* が混在の場合はどのように分離するのか。

答（小林秀樹）

①遺伝子レベルで検出するのはPCRを用いれば容

易である。分離に関しては昔と変わりはなく、非常に時間と手間がかかるだけで難しいわけではない。

② *M. hyorhinis* との混在の場合、基本的にはどのくらいの比率で混在しているかが重要である。*M. hyopneumoniae* : *M. hyorhinis* が1000 : 1などの場合は希釈倍率を調整すれば *M. hyopneumoniae* だけを分離できるが、10 : 1などの場合、分離は行わない。

発言（佐藤静夫，科飼研）

わが国での鶏の *M. gallisepticum* (MG) の最初の分離は、鶏腎細胞培養を介して行われたので、細胞培養中に含まれるストレプトマイシン100ppmに耐性化したMGが分離されてきた。また、養豚界では、呼吸器病対策にストレプトマイシン注射が常用されましたので、耐性株の選択が進んだものと思われます。

質問（江口正志，畜安研）

今日は耐性の獲得、耐性状況についてお話頂いたが、抗生物質の使用についてはどのような方法が望ましいとお考えですか。

答（小林秀樹）

ひとつの農場に蔓延している株はそれほど多くはなく1~2種類である。まず薬剤を投与する前にマクロライドならばマクロライドに対する感受性があるかをどのような形でもよいので調べるべきである。自然に突然変異などで耐性が出現してしまうのは仕方がないので、まずは感受性の有無を確認してから、投薬することが望ましい。つまり、投薬しようと考えている薬剤のスクリーニングが大切である。