

10. 大分県内で過去5年間に分離された *Mycoplasma bovis*の疫学的解析

大分家畜保健衛生所、宇佐家畜保健衛生所¹⁾

○病鑑 山本史子・滝澤亮（病鑑）¹⁾・首藤洋三（病鑑）

【はじめに】

Mycoplasma bovis(Mb)は、牛肺炎を除く牛のマイコプラズマ病の中で最も病原性が強く、牛に肺炎、乳房炎、関節炎等を引き起こす⁴⁾ほか、牛呼吸器複合病（BRDC）の病原体の一つとしても重要である。有効なワクチンはなく、基本的な衛生対策や抗生剤の投与によって予防・治療を行うが、近年は野外分離株がタイロシン、エンロフロキサシン、カナマイシン等の薬剤に対し耐性を示したとの報告^{1), 2), 3), 5)}もある。そこで、県内で過去5年間に分離されたMbを用いて薬剤感受性試験を実施、結果を国内報告と比較し、県内で分離されるMbの薬剤感受性状況の把握（調査①）を実施した。また、ERFX耐性株を用いた遺伝子学的相同性調査も実施（調査②）したので、併せて報告する。

【調査①】

<材料>

調査には大分県内で2007年から2012年の間に分離されたMb50株を用いた。全て病性鑑定を実施した牛から分離した。分離時の病性鑑定診断名は、Mbの単独感染が疑われるもの、細菌との混合感染が疑われるもの、ウイルスとの混合感染が疑われるもの、Mbが分離されたものの、症状へのMbの関与が不明なものがあった。また、株の由来は肺、鼻腔スワブ、脾臓で1個体からは1株のみの分離であった（表1）。

表1

Mb50株分離時の病性鑑定診断名

他の病原体の関与	株の由来	株数	診断名
単独感染	脾臓	1	<i>M. bovis</i> による多発性関節炎
	肺	3	牛マイコプラズマ肺炎
	鼻腔スワブ	16	牛マイコプラズマ肺炎を疑う
細菌との混合感染	肺	1	<i>A. pyogenes</i> の関与による化膿性壊死性気管支肺炎、牛コロナウイルス病の疑い
	肺	1	牛パストツレラ症(ウイルス、マイコプラズマの関与を疑う)
	肺	1	牛マイコプラズマ肺炎および牛パストツレラ症
ウイルスとの混合感染	肺	1	マイコプラズマ肺炎を疑う(細菌の二次感染を疑う)
	肺	1	BRDC(牛パストツレラ(マンヘミア)症、牛マイコプラズマ肺炎に牛RSウイルスの関与を疑う)
	肺	1	牛マイコプラズマ肺炎(牛RSウイルスの関与を疑う)
	鼻腔スワブ	7	牛RSウイルス病とマイコプラズマ病を強く疑う
	鼻腔スワブ	2	牛コロナウイルス病および牛マイコプラズマ肺炎を疑う
	肺	2	慢性細菌性肺炎
<i>M. bovis</i> の関与不明	鼻腔スワブ	2	牛RSウイルス病
	肺	1	牛パストツレラ症
	肺	1	BRDC
	肺	1	-
マイコプラズマ検査	肺	1	-
	鼻腔スワブ	8	-

<方法>

1) 薬剤感受性試験

エリスロマイシン (EM)、タイロシン (TS)、オキシテトラサイクリン (OTC)、リンコマイシン (LCM)、エンロフロキサシン (ERFX)、オフロキサシン (OFX) に対する最良発育阻止濃度 (MIC) を、微量液体希釈法によって測定した。基準株として、MbPG45株を使用した。

2) 国内報告との比較

調査に供した菌株のうち90%の菌株の発育を阻止する濃度であるMIC₉₀を用いて、3報告¹⁾、²⁾、³⁾と比較した。

<結果>

1) 薬剤感受性試験

Mb50株のMIC、基準株MbPG45株のMIC、MIC₅₀、MIC₉₀、ブレイクポイント (BP) は表2のとおりとなった。

EMは、基準株と同様に全ての菌株が高いMICを示し、自然耐性であると考えられた。TS、OTCは、全ての株が基準株と比較し、高いMICを示していた。これらのMIC₅₀は高い値であり、大部分の株が耐性化していると考えられた。

ERFX、OFXは一部の株が基準株と比較し高いMICを示し、ERFXには14株が、OFXには13株が耐性となった。これらのMIC₅₀とMIC₉₀の幅は大きく、耐性化傾向にあると考えられた。

表2

	MIC (μg/ml)													MIC ₅₀	MIC ₉₀	BP
	≤0.1	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	100<			
EM									2	2	6	26	14	100	100<	-
TS				○			3	2	17	22	6			25	50	-
OTC				○					5	17	23	2	3	50	50	-
LCM 1				2	13	15	19							1.6	3.2	-
TP			1		1	3	7	22	12	4				6.3	12.5	-
ERFX			7	21	6	2		4	8	2				0.4	12.5	3.2
OFX			1	3	6	20	7		11	1		1		1.6	12.5	6.3

○ 基準株 *M. bovis* PG45株のMIC

2) 国内報告との比較

OTC、TSが高値、LCM、TPが低値で、国内報告と同様の傾向を示した。OTCには90年代から高値、TSには90年代は低値であったものの、2000年代には高値を示していた。LCM、TPには90年代から低値を示していた。ERFXは、全ての報告と比較し高値を示していた (表3)。

表3

国内報告とのMIC₉₀比較

分離年	1996～1997 (日本)	2004～2005 (山形県)	2005～2008 (栃木県)	2007～2012 (大分県)
OTC	50	16	50	50
TS	6.25	32	50	50
LCM	3.12	NT	3.12	3.2
TP	12.5	8	12.5	12.5
ERFX	0.2	0.25	1.56	12.5
OFX	NT	NT	NT	12.5

MIC₉₀
($\mu\text{g/ml}$)

<考察>

薬剤感受性試験の結果、LCM、TPに大部分の株が感受性傾向、OTC、TSに大部分の株が耐性化傾向であり、この結果は国内報告と同様のものではなかった。ERFXに一部の株が耐性化しており、MIC₉₀が高値であったが、これはMIC₉₀が低値であるという国内報告とは異なった。この結果から、県内で同一のERFX耐性株がまん延した可能性があるのではないかと考察し、ERFX耐性株を用いた遺伝子学的同一性比較を実施した。

【調査②】

<材料>

6農場由来ERFX耐性Mb14株を用いた。ERFXのMICは6.3～25 $\mu\text{g/ml}$ で、MICパターンは6パターンであった。1農場あたりの株数は1～5株であった。分離時の診断名は、ウイルスや他の細菌との混合感染が疑われるものであった(表4)

表4

農場	飼養形態	ERFXのMIC ($\mu\text{g/ml}$)	MICパターン (一管差以内 同一)	株数	診断名
A	繁殖	12.5～25	1	5	○牛マイコプラズマ肺炎および牛パストツレラ症 ○A. pyogenesの関与による化膿性壊死性気管支肺炎、 (牛コロナウイルス病の疑い)
B	繁殖	12.5	1	3	○牛パストツレラ症 (ウイルス、マイコプラズマの関与を疑う) ○慢性細菌性肺炎
C	繁殖	6.3	2	1	○診断名不明(マイコプラズマ検査のみ)
D	繁殖	6.3	3	2	○牛マイコプラズマ肺炎(牛RSウイルスの関与を疑う)
E	子牛育成	6.3～12.5	4、5	2	○BRDC
F	肥育	25	6	1	○診断名不明(マイコプラズマ検査のみ)

MICパターン・・・薬剤感受性試験の結果を元に、EM、TS、OTC、LCM、TP、ERFX、OFXに
対するMICをパターン化したもの。一管差以内を同一とした。

<方法>

制限酵素Sma I、Mlu I（タカラバイオ株式会社）を用いて、パルスフィールドゲル電気泳動法によって型別し、MICパターンと併せ相同性比較を実施した。

<結果>

Sma I の切断パターンは、A、B農場分離株でほぼ同一、D、E農場分離株で農場ごとに同一、その他の農場では異なっていた（図1）

Mlu I では、A、B農場分離株はほぼ同一、D農場分離2株も同一、E農場分離2株は異なっていた（図2）。

PFGE型とMICパターンにより相同性比較を行うと、A、B農場分離8株は、PFGE型、MICパターンが一致しており、近縁株であると考えられた。D農場分離2株もPFGE型、MICパターンは一致しており、近縁株であると考えられた。E農場分離2株のPFGE型は、制限酵素

Sma I を用いた場合は同一であったが、制限酵素Mlu I を用いた場合は異なり、MICパターンも異なっていた（表5）。

<考察>

A、B農場分離株のPFGE、MICパターンが一致し、同一由来の近縁株であることが確認され、農場外からERFX耐性Mbが侵入した可能性もあると考えられた。

C、D、E、F農場分離株のPFGE、MICパターンはそれぞれ異なり、株の由来が異なることが確認されたが、農場内

でERFXに耐性化したのか、農場外からERFX耐性株が侵入したのかは不明であると考えられた。A農場からは5年間、ERFXに耐性で同一由来の近縁株が分離されていたことから、農場内にMbが定着しやすい可能性があると考えられた。

【まとめ】

Mbが複数の薬剤に対し耐性を示したこと、現在感受性のある薬剤に対しても自然に耐性化することは避けられないことから、改めて薬剤感受性試験の結果に基づいた治療が必要であると考えられた。

また、ERFXについては農場内で耐性化した可能性もあることから、2次選択薬として使

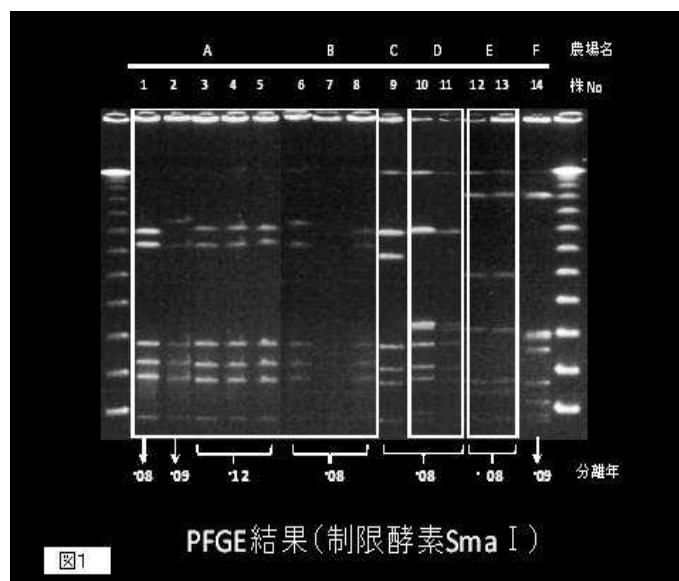


図1

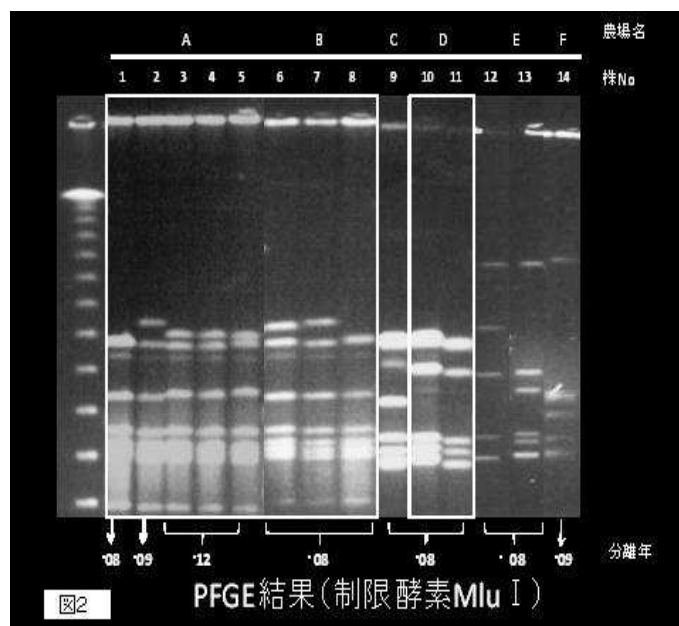


図2

用する、投与後3日程度で効果判定を実施する等、ERFXの使用方法の再徹底を行う必要があると考えられた

マイコプラズマの薬剤感受性試験には時間を要するため、少なくとも一度Mbを原因とした感染症の発生があった農場においては、定期的なモニタリングを実施し、その結果を治療に反映させる必要があると考えられた。

表5 遺伝子学的同一性比較まとめ

菌株名	農場名	分離年	PFGE型		MIC パターン
			Sma I	Mlu I	
1	A	2008	I	a	1
2		2009	I	a	1
3		2012	I	a	1
4		2012	I	a	1
5		2012	I	a	1
6	B	2008	I	a	1
7		2008	I	a	1
8		2008	I	a	1
9	C	2008	II	b	2
10	D	2008	III	c	3
11		2008	III	c	3
12	E	2008	IV	d	4
13		2008	IV	e	5
14	F	2009	V	f	6

- 1) Hirose et al, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public health*, 50 : 347-351 (2003)
- 2) 加藤ら 日獣会誌, 61, 294-298 (2008)
- 3) 小池ら 日獣会誌 64 , 45-49 (2011)
- 4) 興水ら マイコプラズマとその実験法 (1988)
- 5) 小林秀樹 動物抗菌会報32, 25-31 (2010)